

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Estudo da qualidade sensorial de rolhas de cortiça natural

Tese de Mestrado

de

Liliana da Silva Mendanha

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizada na

Amorim & Irmãos S.A. - Investigação e Desenvolvimento



Orientador na FEUP: Professora Doutora Margarida Bastos

Orientador na Amorim & Irmãos S.A.: Professor Doutor Miguel Cabral



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Departamento de Engenharia Química

Julho de 2015

Agradecimentos

Ainda que possa parecer uma formalidade, de facto não o é, pois é profundo o reconhecimento que devo aos meus orientadores. Ao Professor Doutor Miguel Cabral, por ser um exemplo de dedicação e profissionalismo. Agradeço, ainda, a disponibilidade e simpatia com que sempre me recebeu. À Professora Doutora Margarida Bastos, minha orientadora e professora, por todo o conhecimento transmitido e pela amabilidade demonstrada, não só ao longo do estágio, mas ao longo de todo o curso.

Uma palavra de reconhecimento ao Doutor Paulo Lopes, pelo acompanhamento e ajuda dedicadas ao longo do estágio, bem como todos os conselhos fundamentais para a consecução do meu trabalho.

À Doutora Isabel Roseira pela simpatia, interesse e pela franca e aberta colaboração ao longo desta etapa.

À Ana Malheiro, por me ter apoiado e ensinado. Obrigada por toda a paciência e ajuda indispensável ao longo deste tempo. À Eliana Reis por, mesmo nos dias mais complicados, ter arranjado tempo para me ajudar e ensinar. Às restantes colaboradoras do I&D, Patrícia Oliveira, Salomé Reis e Rosa Castro e aos meus colegas Frederico Machado e Diana Alves, pelo apoio e amizade com que me receberam. A todos os colaboradores do *LabCork*, mas em particular ao Armindo Couto, à Conceição Silva e ao Paulo Aguiar pela constante boa disposição com que me presentearam. A todos, o meu muito obrigada, pois tornaram a minha integração muito mais fácil.

Aos meus amigos Filipe Correia, Carolina Costa, Carolina Sá, Joana Pereira e Francisco Portugal, por serem os melhores amigos que se poderia pedir e por serem insubstituíveis. À Ana Almeida por toda a amizade e companheirismo ao longo do curso.

Um enorme obrigada à minha família, em particular aos meus avós e ao meu pai, que sempre me apoiaram e incentivaram para dar o meu melhor.

Claro que não posso deixar de agradecer profundamente ao meu irmão por ser a melhor pessoa do mundo e por, apesar de longe, nunca me ter deixado sentir sozinha.

Por fim, mas nem por sombras por último, à minha mãe por ser uma heroína e um exemplo de dedicação e perseverança. Obrigada por me ensinares que “para fazer uma torrada não é preciso ficar a segurar na torradeira.”

Resumo

A contaminação de rolhas de cortiça, em especial com 2,4,6-tricloroanisol (TCA), continua a ser a principal preocupação da indústria corticeira. Por isso, é fundamental perceber a partir de que concentrações este composto afeta as propriedades organoléticas de diferentes vinhos. Para determinar o limiar de detecção, recorreu-se a um painel de provadores especializados para provar vinhos com diferentes características: brancos, tintos, espumantes e vinhos do Porto. O presente projeto estudou, também, a incidência de diferentes contaminantes em rolhas de cortiça natural, recorrendo tanto à análise sensorial, como à cromatografia. No primeiro caso, utilizou-se a “maceração” a seco e a maceração em água, enquanto, na segunda situação, recorreu-se à análise por SPME GC-MS para análise dos compostos geosmina, oct-1-en-3-ol e MIB.

O desenvolvimento deste trabalho permitiu concluir que o limiar de detecção do painel de provadores era, na maioria dos vinhos, muito baixo, tendo sido detetadas concentrações de TCA na ordem dos 0,5 ng/L. Concluiu-se, ainda, que são muitos os compostos que podem contaminar negativamente as rolhas de cortiça. Porém, o TCA deve continuar a ser o principal composto em estudo já que é detetado até concentrações muito inferiores aos restantes contaminantes analisados.

Palavras/ Expressões-chave: Análise sensorial, Limiar de detecção, TCA, Rolhas de cortiça natural

Abstract

Contamination of cork stoppers, especially with 2,4,6-trichloroanisole (TCA), remains the main concern of the cork industry. Therefore, it is crucial to determine the concentration of TCA at which the organoleptic properties of different wines are affected. To determine the detection threshold, a specialized panel of tasters was requested to taste wines with different characteristics: white, red, sparkling and Porto wine. This project also studied the incidence of different contaminants in natural cork stoppers, by means of both sensory analysis and chromatography. In the first case, the methods dry “soak” and soak were used, while in the second case, it was used the analysis by SPME GC-MS to analyse compounds such as geosmin, oct-1-en-3-ol and MIB.

The development of this work allowed to conclude that the boundary of detection of the tasting panel was, in most of the wines, very low and were detected TCA concentrations in the range 0,5 ng/L. It was also concluded that there are many compounds which may adversely contaminate cork stoppers. Nevertheless TCA should continue to be the main compound in study, as it is detected in much lower concentrations compared to the other contaminants analyzed.

Keywords: Sensory analysis, Detection threshold, TCA, Natural cork stoppers

Declaração

Liliana da Silva Mendanha declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Porto, 6 de julho de 2015

(Liliana Mendanha)

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e apresentação do projeto	1
1.2	Apresentação da empresa	2
1.3	A cortiça e os seus principais contaminantes.....	4
1.3.1	O 2,4,6-tricloroanisol.....	5
1.3.2	Outros contaminantes da cortiça	8
1.4	Estratégias de remoção, prevenção e controlo do TCA.....	11
1.5	Contributos do trabalho	15
1.6	Organização da tese	16
2	Contexto e Estado da Arte	17
3	Descrição técnica	21
3.1	Determinação dos limiares de deteção e de rejeição do TCA em diferentes tipos de vinho	21
3.2	Incidência de diferentes contaminantes em rolhas de cortiça.....	24
3.2.1	Comparação de dois métodos para realização de análise sensorial.....	24
3.2.2	Rolhas sensorialmente triadas	25
3.2.3	Identificação de contaminantes em rolhas de cortiça por SPME GC-MS.....	27
4	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Determinação dos limiares de deteção e de rejeição do TCA em diferentes tipos de vinho	29
4.2	Incidência de diferentes contaminantes em rolhas de cortiça.....	31
4.2.1	Comparação de dois métodos para realização de análise sensorial.....	32
4.2.2	Rolhas sensorialmente triadas	35
4.2.3	Identificação de contaminantes em rolhas de cortiça por SPME GC-MS.....	38
5	Conclusões	40
6	Avaliação do Trabalho Realizado	41

6.1	Objetivos Realizados	41
6.2	Outros Trabalhos Realizados.....	41
6.3	Limitações e Trabalho Futuro	42
6.4	Apreciação final	43
Anexo 1 - Propriedades químicas dos vinhos estudados na CVRVV		48
Anexo 2 - Características dos lotes utilizados na comparação dos dois métodos de análise sensorial		49
Anexo 3 - Equipamento cromatográfico		50
Anexo 4 - Método utilizado para análise por SPME GC-MS		51
Anexo 5 - Parâmetros da análise cromatográfica dos compostos de interesse		53
Anexo 6 - Limites de quantificação		56
Anexo 7 - Cálculo do LD e do LR pelos dois métodos estatísticos		57

Índice de Figuras

Figura 1 - Roda de aromas sensoriais da cortiça.	5
Figura 2 - Mecanismo de formação do TCA.	8
Figura 3 - Ações e tecnologias desenvolvidas e implementadas pela A&I no combate ao TCA.	13
Figura 4 - Evolução da concentração de TCA presente em rolhas de cortiça natural.	14
Figura 5 - Excerto da folha de prova utilizada nas provas de vinho.....	21
Figura 6 - Esquema do copo utilizado nas provas de vinhos.	22
Figura 7 - Equipamento de análise por GC-MS: a) auto-sampler; b) GC; c) MS.	50
Figura 8 - Programa de temperaturas.	51
Figura 9 - Reta de calibração da geosmina.	54
Figura 10 - Reta de calibração do oct-1-en-3-ol.....	54
Figura 11 - Reta de calibração do MIB.....	55
Figura 12 - Reta de calibração do TCA.	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Os vários tipos de rolhas.	3
Tabela 2 - Características dos principais contaminantes da cortiça.	9
Tabela 3 - Principais descritores sensoriais da cortiça.	10
Tabela 4 - Principais tecnologias patenteadas pela A&I.	12
Tabela 5 - Valores obtidos para LD e LR de TCA em diferentes vinhos.	18
Tabela 6 - Informações relativas aos vinhos usados nas provas sensoriais.	23
Tabela 7 - Características das rolhas analisadas sensorialmente.	26
Tabela 8 - Família de aromas e descritores mais frequentes.	27
Tabela 9 - Limiares de deteção (LD) e rejeição (LR) de TCA para os diferentes vinhos.	30
Tabela 10 - Resultados comparativos da utilização dos dois métodos de análise sensorial.	33
Tabela 11 - Resultados obtidos quanto à incidência de rolhas sensorialmente contaminadas.	36
Tabela 12 - Lista dos descritores mais frequentes.	37
Tabela 13 - Limites de quantificação do método e LD no vinho para os vários compostos.	38
Tabela 14 - Propriedades químicas dos vinhos utilizados nas provas sensoriais.	48
Tabela 15 - Características dos lotes estudados na comparação dos métodos de análise sensorial.	49
Tabela 16 - Programa de temperaturas.	51
Tabela 17 - Parâmetros da análise cromatográfica dos compostos de interesse.	53
Tabela 18 - Determinação do LD do vinho Cuvée Saint-Vincent através o método binomial.	57
Tabela 19 - Determinação do LD do vinho Cuvée Saint-Vincent através do método BET.	57
Tabela 20 - Determinação do LD do espumante Le Tose através o método binomial.	58
Tabela 21 - Determinação do LD do espumante Le Tose através do método BET.	58
Tabela 22 - Determinação do LD do vinho St. Hallett através o método binomial.	59
Tabela 23 - Determinação do LD do vinho St. Hallett através do método BET.	59
Tabela 24 - Determinação do LD do vinho Herbert Bretz através o método binomial.	60
Tabela 25 - Determinação do LD do vinho Herbert Bretz através do método BET.	60
Tabela 26 - Determinação do LD do vinho Beaujolais Nouveau através o método binomial.	61
Tabela 27 - Determinação do LD do vinho Beaujolais Nouveau através do método BET.	61
Tabela 28 - Determinação do LD do vinho Château D'Aurillac através o método binomial.	62

Tabela 29 - Determinação do LD do vinho Château D'Aurilhac através do método BET.	62
Tabela 30 - Determinação do LD do champanhe Bernard Robert através o método binomial.	63
Tabela 31 - Determinação do LD do champanhe Bernard Robert através do método BET.	63
Tabela 32 - Determinação do LD do vinho Domaine Cheillon-Chezeaux através o método binomial. ...	64
Tabela 33 - Determinação do LD do vinho Domaine Cheillon-Chezeaux através do método BET.	64
Tabela 34 - Determinação do LD do vinho Château Roquefort Rouge através o método binomial.	65
Tabela 35 - Determinação do LD do vinho Château Roquefort Rouge através do método BET.....	65
Tabela 36 - Determinação do LD do vinho J. Lohr através o método binomial.	66
Tabela 37 - Determinação do LD do vinho J. Lohr através do método BET.....	66
Tabela 38 - Determinação do LD do vinho Louis M. Martini através o método binomial.	67
Tabela 39 - Determinação do LD do vinho Louis M. Martini através do método BET.....	67
Tabela 40 - Determinação do LD do vinho do Porto Branco através o método binomial.	68
Tabela 41 - Determinação do LD do vinho do Porto Branco através do método BET.	68
Tabela 42 - Determinação do LD do vinho do Porto Tawny através o método binomial.	69
Tabela 43 - Determinação do LD do vinho do Porto Tawny através do método BET.	69
Tabela 44 - Determinação do LD do vinho do Porto Ruby através o método binomial.	70
Tabela 45 - Determinação do LD do vinho do Porto Ruby através do método BET.	70

Notação e Glossário

Lista de Siglas

A&I	Amorim & Irmãos S.A.
CVRVV	Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
d ₅ -TCA	2,4,6-Tricloroanisol deuterado
d ₅ -4EG	4-Etilguaicol deuterado
GC	Cromatografia em fase gasosa
I&D	Investigação e Desenvolvimento
Ld	Limite mínimo de deteção
LD	Limiar de deteção
LR	Limiar de rejeição
MDI	Máquina de Deteção Individual
MIB	2-metilisoborneol
MS	Espetrometria de massa
m/z	Razão massa/carga do ião
SPME	Micro-extração em fase sólida
TCA	2,4,6-Tricloroanisol

1 Introdução

1.1 Enquadramento e apresentação do projeto

A indústria corticeira vive, atualmente, uma verdadeira corrida em busca do aprimoramento dos seus métodos, processos e equipamentos com o intuito de fornecer produtos de alto nível de qualidade em todos os segmentos de mercado. Um dos maiores desafios com que esta indústria se vem a debater, desde o final do século XX, prende-se com a erradicação de compostos como halofenóis e haloanisóis das rolhas de cortiça, responsáveis por desvios sensoriais, tais como mofo e bafio. O mau odor, pontualmente presente nas rolhas, reflete-se no aroma e no sabor do vinho e torna-se o principal responsável pela sua deterioração sensorial. Dado o exponencial aumento do consumo de vinho, os consumidores estão, genericamente, mais atentos e sensíveis, uma vez que têm conhecimentos cada vez mais aprofundados acerca desta bebida. Assim sendo, a problemática da contaminação do vinho com 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) é, nos dias de hoje, mais pertinente e importante do que nunca, pelo que esta situação capta particular atenção por parte dos produtores de vinho e da indústria corticeira. Embora o TCA tenha sido objeto de vários estudos, a concentração a partir da qual este composto pode afetar a qualidade sensorial de diferentes tipos e estilos de vinho permanece pouco consensual. Daí que um dos objetivos deste trabalho se prenda com a determinação dos limiares de deteção (LD) e de rejeição (LR) de TCA em vinhos de diferentes castas e de diferentes proveniências, através de um painel de provadores especialistas na análise sensorial de vinhos.

O TCA é tido como o principal responsável pela rejeição sensorial de vinhos, todavia não é o único composto que prejudica a qualidade de um vinho. Daqui, advém a imensa pertinência do primeiro objetivo deste estudo: perceber de que forma determinados compostos poderão afetar sensorialmente diferentes tipos de vinho. Deste problema decorre o segundo objetivo deste trabalho de investigação: determinação da incidência de rolhas de cortiça contaminadas não só com TCA, mas também com outros contaminantes. Conhecendo os compostos com aromas desagradáveis presentes nas rolhas, pretende-se proceder a um engarrafamento utilizando as rolhas com diferentes odores para perceber qual o seu impacto no vinho.

1.2 Apresentação da empresa

A Corticeira Amorim, S.G.P.S., S.A., fundada em 1870, é a maior produtora e fornecedora de rolhas de cortiça a nível mundial com 35% da transformação mundial de cortiça e uma produção anual de 4 mil milhões de rolhas. Conta com 84 empresas e 30 unidades industriais espalhadas um pouco por todo o mundo e vende para mais de 20 mil clientes, o que representa um volume de negócio anual de cerca de 543 milhões de euros. Em cada ano, são investidos cerca de seis milhões de euros em Investigação e Desenvolvimento (I&D). A atividade empresarial da Corticeira Amorim estende-se a cinco principais áreas de negócio: matérias-primas, rolhas, revestimentos, aglomerados compósitos e isolamentos, daí a relevância desta organização quer para a economia, quer para a investigação científica nacionais (Corticeira Amorim, 2014).

A unidade de negócio de rolhas, Amorim & Irmãos, S.A. - A&I -, integra diversas empresas não só de produção, mas também de distribuição localizadas em todos os países produtores e engarrafadores de vinho. Esta é a principal unidade de negócio da Corticeira Amorim S.G.P.S, S.A., representando 64% do volume total de negócios. A Amorim & Irmãos, como maior produtor e fornecedor de rolhas de cortiça a nível mundial apresenta um vasto leque de produtos para satisfazer todas as necessidades e exigências do mercado, tal como se encontra representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Os vários tipos de rolhas.

Grupo	Subgrupo
Rolha Natural Fabricada, por brocagem, a partir de pranchas de cortiça	<u>Monopeça</u> Fabricadas diretamente a partir de uma prancha de cortiça
	<u>Multipeça</u> Fabricadas a partir de duas ou mais metades de cortiça natural coladas entre si através de uma cola à base de poliuretano
	<u>Acquamark®</u> Rolhas com os poros preenchidos exclusivamente com pó de cortiça
Rolha Técnica Constituídas por um corpo de cortiça aglomerada (grânulos de cortiça colados entre si por uma cola de poliuretano) com ou sem discos de cortiça natural colados no(s) seu(s) topo(s)	<u>Spark®</u> Rolhas com um corpo aglomerado (2 a 7 mm) e 2 discos de cortiça colocados num dos topos para vedar vinhos espumantes
	<u>Twin Top®</u> É constituída por um disco de cortiça natural em ambos os topos e um corpo aglomerado (3 a 8 mm)
	<u>Aglomerada</u> Rolhas que são inteiramente fabricadas a partir de granulados da cortiça (2 a 4 mm) ligados por um adesivo alimentar e resultantes da produção de rolhas naturais.
	<u>Neutrocork®</u> Formada por grânulos finos de cortiça natural (1 a 2 mm) ligados entre si por um adesivo alimentar
Rolha Capsulada (Top Series®) Rolhas de cortiça natural onde no topo é colocada uma cápsula que pode ser de vários materiais. É geralmente utilizada em vinhos licorosos ou em bebidas espirituosas	

1.3 A cortiça e os seus principais contaminantes

A cortiça é um material totalmente natural e renovável, sendo extraída do tronco do sobreiro - *Quercus suber* L. -, cujo habitat se encontra em locais próximos do Mediterrâneo: sul da Europa e Norte de África. Os montados de sobreiro ocupam uma área estimada de 2,2 milhões de hectares, dos quais 61% se encontram na Península Ibérica. A produção mundial de cortiça, em cada ano, é de cerca de 201 mil toneladas, detendo o nosso país aproximadamente 50% dessa produção. Em Portugal, o sobreiro ocupa mais de 736 mil hectares que se encontram localizados essencialmente a sul do rio Tejo (APCOR, 2014).

O primeiro descortiçamento, “desboia”, realiza-se quando o sobreiro tem 25 anos, procedendo-se, então, à extração da chamada “cortiça virgem”. O segundo descortiçamento ocorre passados nove anos, denominando-se esta cortiça como “secundeira”. Os posteriores descortiçamentos realizam-se a cada nove anos e a cortiça, “amadia”, já tem qualidade suficiente para ser utilizada na produção de rolhas. A cortiça virgem, a secundeira e as sobras da produção de rolhas naturais e de discos são utilizados para a produção de granulado de cortiça para rolhas técnicas e para outros produtos como, por exemplo, acessórios de moda ou calçado (Idem).

A cortiça “amadia” apresenta propriedades muito específicas dada a sua composição química: suberina (39,4%) - principal componente que lhe confere as propriedades mecânicas e de impermeabilidade -, lenhina (24%) - confere suporte para os outros componentes estruturais da parede celular -, polissacarídeos (19,9%), extrativos (14,2%) e cinzas (1,2%). Esta composição faz com que a cortiça se apresente como um produto com características únicas e de exceção, como a elasticidade, a leveza, a impermeabilidade a líquidos e gases, a capacidade de isolamento térmico e acústico, a combustão lenta e a resistência ao atrito (Fortes *et al.*, 2004).

Apesar de a cortiça ser um produto com propriedades tão distintas como as sinalizadas no parágrafo anterior, ela é um produto natural, pelo que pode sofrer contaminações de diferentes índoles. Esta situação poderá desencadear alterações nas suas propriedades, tanto mecânicas, como visuais ou mesmo odoríficas. A migração de compostos de aroma indesejável existentes na superfície da cortiça tem sido referida como sendo a principal causa do aparecimento de alterações organoléticas em vinhos. Estes compostos estão, na sua maioria, relacionados com a atividade microbiológica que a cortiça pode sofrer desde o montado de sobreiro até ao engarrafamento e que levam à formação de metabolitos secundários voláteis. Os desvios sensoriais relacionados com a cortiça podem ser agrupados de acordo com a roda de

aromas que se encontra na Figura 1. Estes desvios estão associados à presença de vários compostos voláteis ou semi-voláteis na cortiça, onde se destacam os compostos designados por 2,4,6-tricloroanisol (TCA), 2-metoxifenol (guaiacol), oct-1-en-3-ol, oct-1-en-3-ona, 2-metilisoborneol (MIB), (4S,4aS,8aR)-4,8a-Dimetil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidronaftalen-4a-ol (geosmina), 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) e 2-isopropil-3-metoxipirazina (IPMP), compostos estes que serão estudados no decorrer deste trabalho.

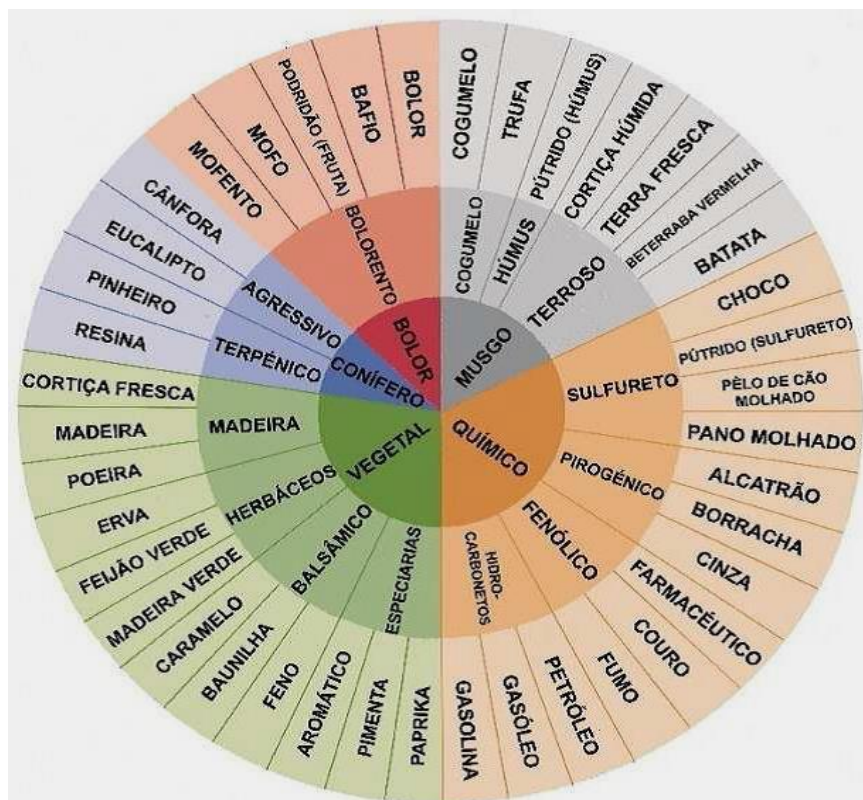


Figura 1 - Roda de aromas sensoriais da cortiça (Retirado de Moutinho, 2008).

1.3.1 O 2,4,6-tricloroanisol

O 2,4,6-Tricloroanisol, TCA, é um composto presente na natureza, cuja formação ocorre quando microrganismos, tais como os fungos, entram em contacto com compostos à base de cloro, geralmente clorofenóis. Este composto é quimicamente estável e, não sendo degradado com o tempo, pode contaminar o vinho desde concentrações ínfimas quando existe um contacto direto entre o vinho e o material contaminado. Um elevado número de rolhas de

cortiça natural encontra-se contaminada com TCA, contudo na, sua maioria, este composto não chega a contaminar o vinho (Howland *et al.*, 1997; Capone *et al.*, 1999). Foram realizados estudos (Capone *et al.*, 1999; Capone *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2011) que confirmam que apenas ocorre contaminação quando a superfície da rolha, ou a câmara-de-ar imediatamente acima, que contacta diretamente com o vinho se encontram contaminadas. A percentagem de TCA suscetível de migrar para o vinho varia de 0,6-25%. Estes valores são influenciados pela quantidade de superfície de rolha em contacto com o vinho, a temperatura e o tempo de estágio na garrafa (Juanola *et al.*, 2004).

De acordo com alguma literatura (Simpson e Sefton, 2007), existem várias causas para a contaminação dos vinhos com TCA, todavia nem todas envolvem a cortiça, nomeadamente: contaminação através do contacto com barricas, rolhas de cortiça ou, ainda, com maquinaria vinícola ou equipamento de engarrafamento, etc.. A cortiça pode ser contaminada com TCA, a partir de: fungos suspensos no ar, compostos à base de cloro presentes nas adegas e caves, equipamento de transporte ou paletes de expedição, adsorção direta de TCA na cortiça, entre outros (Buser *et al.*, 1982). Os mesmos autores referem que a migração de haloanisóis, em particular TCA, para o vinho é a responsável pelo habitualmente designado “gosto a rolha” e resulta do contacto da superfície da rolha de cortiça contaminada com TCA com o vinho. O TCA é o composto mais abordado pelos investigadores, pois produz um intenso odor a mofo, bolor ou bafio e consegue ser detetado em concentrações tão ínfimas como 30-300 pg/L na água (Curtis *et al.*, 1974; Griffiths, 1974) ou 3 ng/L no vinho (Boutou e Chatonnet, 2006).

Vinhos contaminados com TCA apresentam frequentemente outros cloroanisóis e bromoanisóis, como é o caso do 2,4-dicloroanisol (2,4-DCA), do 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), do pentacloroanisol (PCA) e do 2,4,6-tribromoanisol (TBA). Estes compostos derivam de anisóis que se combinam com um ou mais átomos de um halogéneo, como o cloro ou o bromo. Porém, o principal composto que contribui para a contaminação do vinho é o TCA, já que, apesar de estes cloroanisóis e bromoanisol apresentarem aromas indesejados, o TCA é o que apresenta limiares de deteção sensorial inferior (Sefton e Simpson, 2005).

Diferentes estudos têm proposto diferentes hipóteses para a formação de TCA. Na Figura 2 apresentam-se sistematizados os possíveis mecanismos que se apresentam de seguida.

I - Catabolismo de compostos clorados complexos

Segundo Tanner *et al.*, 1981) ocorre formação de TCA, a partir do catabolismo de compostos clorados complexos como o PCP e o TeCP. Estes compostos sofrem biometilação para os respetivos anisóis que, posteriormente sofrem desalogenação para TCA.

Já o hexaclorociclohexano pode sofrer uma desidroalogenação dando origem ao 1,3,5-triclorobenzeno, que, por sua vez, sofre uma hidroxilação, originando TCP, que é, por fim, metilado a TCA.

II - Desalogenação de anisóis clorados complexos

É sugerido, ainda, por Tanner *et al.*, 1981) que compostos como o TeCA e o PCA formam TCA a partir de um processo de desalogenação redutivo.

III - Síntese por halogenação do anisol

Neidleman e Geigert, 1986) consideram que o anisol pode originar TCA por biometilação e subsequente cloração.

IV - Síntese direta por biometilação do TCP

Foi sugerido por Chaudhry e Chapalamadugu, 1991) que os cloroanisóis podem ocorrer na natureza diretamente a partir de biometilação (O-metilação) dos clorofenóis, seus precursores correspondentes.

Esta hipótese IV é considerada a mais plausível, já que, durante muitas décadas, usaram-se PCP, TeCP e TCP como pesticidas e produtos para tratamento da madeira em larga escala. Estes produtos contaminaram, não só os montados de sobro e, conseqüentemente, a cortiça, mas também o material presente nas adegas. Os microrganismos, em particular os fungos filamentosos possuidores da enzima clorofenol O-metiltransferase (CPOMT), sintetizam, quando em contacto com clorofenóis, os cloroanisóis que contaminam o vinho. Assim, este mecanismo é apontado como sendo o principal responsável pela formação do TCA, do TeCA e do PCA (Coque *et al.*, 2006).

Para facilitar a leitura e compreensão dos mecanismos que acabaram de ser descritos e, dada a sua complexidade, apresenta-se, na figura seguinte (Figura 2), um esquema através do qual se sistematizam essas hipóteses. Assim, os diversos compostos, desde que sujeitos às condições descritas, darão origem ao aparecimento do cloroanisol TCA.

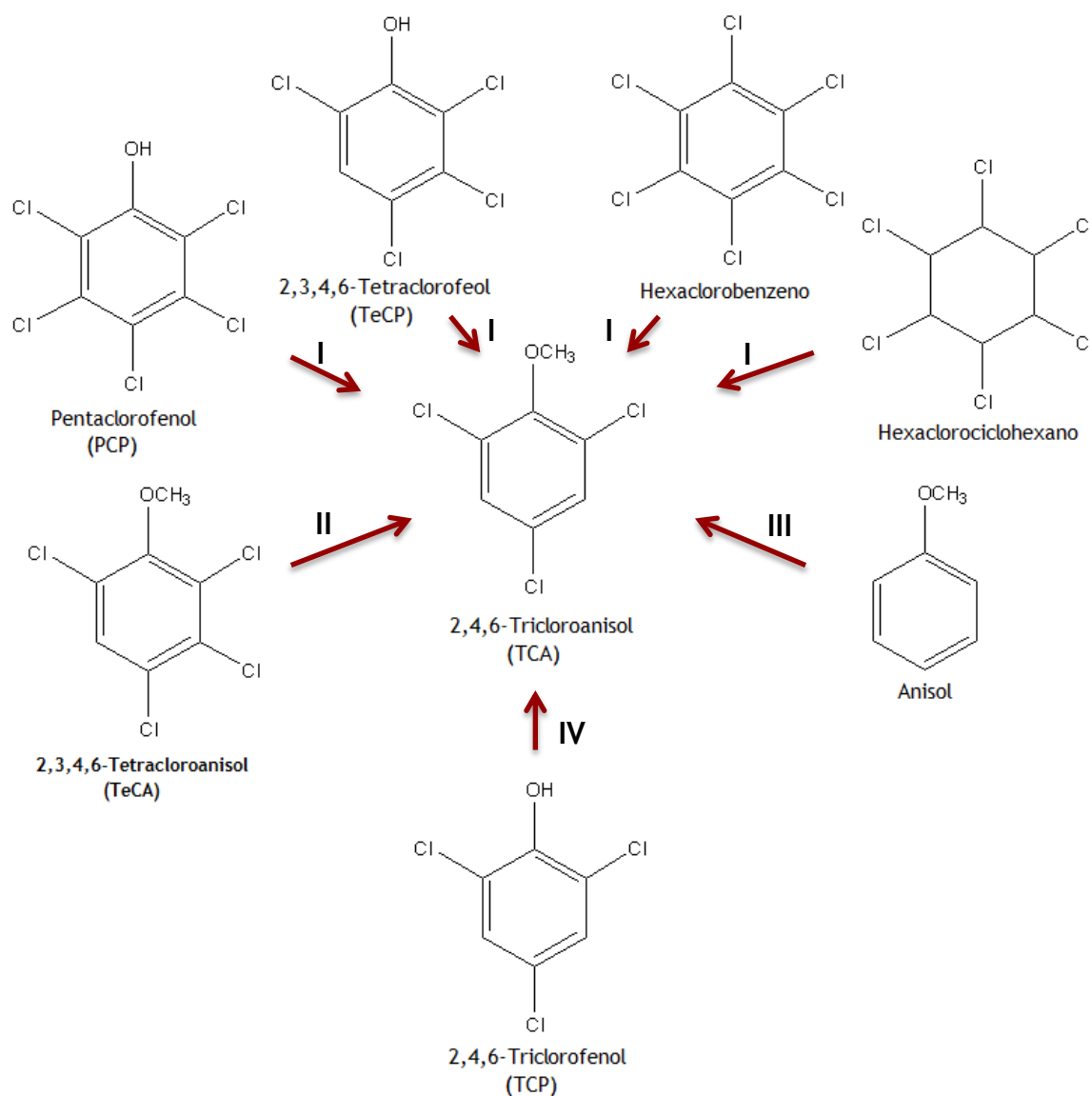
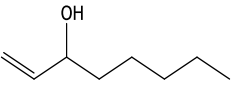
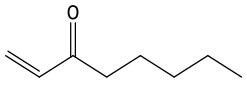
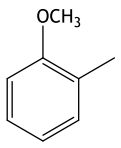
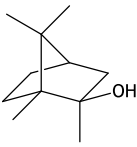
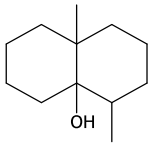
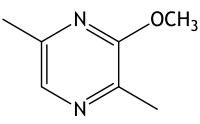
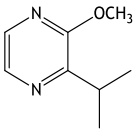


Figura 2 - Mecanismo de formação do TCA (Adaptado de Coque *et al.*, 2006).

1.3.2 Outros contaminantes da cortiça

A presença de outros contaminantes da cortiça, que não TCA, foi sinalizada por vários autores: Simpson, 1990; Capone *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2005. Contudo, ainda nos dias de hoje, não estão todos completamente estudados e compreendidos. As informações sobre esses contaminantes, que se consideraram fundamentais para a realização deste trabalho, encontram-se detalhadas na Tabela 2 (Boutou e Chatonnet, 2006).

Tabela 2 - Características dos principais contaminantes da cortiça.

Composto	Descritores sensoriais	Limiar de detecção em água e vinho	Estrutura química	Origem
Oct-1-en-3-ol	Cogumelos frescos, trufas, musgo	Água: 2 µg/L Vinho: 40 µg/L		Produzido por fungos presentes nas uvas (Lee e Simpson, 1992)
Oct-1-en-3-ona	Cogumelos frescos, trufas, musgo	Água: 3 ng/L Vinho: 70 ng/L		Produzido por fungos presentes nas uvas (Lee e Simpson, 1992)
Guaiacol	Fumado, farmacêutico, couro	Água: 25 µg/L Vinho: 50 µg/L		Degradação bacteriológica da vanilina (Lefebvre <i>et al.</i> , 1983)
2-metil-isoborneol (MIB)	Cânfora, húmus, bolor	Água: 3 ng/L Vinho: 55 ng/L		Produzido por fungos presentes no solo (Lee e Simpson, 1992)
Geosmina	Terra húmida, mofo, beterraba	Água: 1-10 ng/L Vinho: 50 ng/L		Produzido por fungos presentes no solo (Lee e Simpson, 1992)
2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP)	Vegetal, bolor, terra	Vinho: 2,1 ng/L		Produzido por bactérias (<i>Rhizobium excellencis</i>) (Amon <i>et al.</i> , 1989)
2-isopropil-3-metoxipirazina (IPMP)	Vegetal, pimento verde	Água: 2 ng/L Vinho: 15 ng/L		Uvas atacadas por joaninhas (Pickering <i>et al.</i> , 2004)

Como se pode perceber, a maior parte dos contaminantes estão associados à presença de fungos e bactérias que se encontram nas uvas devido a períodos de grande humidade e momentos de elevada falta de exposição solar. Aos compostos que se encontram descritos na Tabela 2 estão associados odores que foram, no decorrer deste trabalho, agrupados em quatro grupos principais, de acordo com a norma ISO 22308:2005, como se encontra explicitado na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais descritores sensoriais da cortiça.

Família de aromas	Descritor
Químico (Q)	Hidrocarbonetos
	Medicinal
	Farmacêutico
	Solvente
	Tinta
	Fenol
Vegetal (V)	Pimento Verde
	Erva fresca
	Feno
	Eucalipto
Mofo/Bolor (M)	Terra molhada
	Terra
	Bolor/ Mofo seco
	Bolor/ Mofo de cave
Decomposição (P)	Ovo podre
	Chulé
	Rançoso
	Água estagnada

1.4 Estratégias de remoção, prevenção e controlo do TCA

As estratégias de erradicação do TCA assentam em três pilares: prevenção, descontaminação e controlo da qualidade. As primeiras consistem na implementação de ações que visam prevenir a formação de TCA ao longo de toda a cadeia de produção de rolhas, isto é, desde a floresta, até ao consumidor final. As medidas curativas ou de descontaminação têm como objetivo remover ou diminuir para níveis aceitáveis a concentração de TCA nos diferentes produtos utilizados na produção de rolhas: pranchas, discos, granulados ou as próprias rolhas naturais. Finalmente, as estratégias de controlo de qualidade têm em conta a monitorização dos diferentes produtos usados na produção de rolhas de cortiça, através de análises cromatográficas e análises sensoriais (Cabral *et al.*, 2009).

Ao longo dos anos e dada a elevada importância do TCA como contaminante, a indústria corticeira tem desenvolvido vários processos e tecnologias de combate a este cloroanisol. Para tentar prevenir a formação de TCA, foram definidas regras respeitantes às boas práticas dos profissionais da indústria corticeira e do setor rolheiro. Em 1999, surgiu a Certificação Internacional SYSTECODE, que consiste num sistema de adesão voluntária para verificar e certificar, através de uma auditoria anual, as empresas produtoras de rolhas de cortiça que cumpram as regras estipuladas no Código Internacional de Práticas Rolheiras (CIPR). Não utilizar produtos de limpeza que contenham halogéneos, evidenciar que a tinta utilizada para a marcação das rolhas cumpre a legislação para os metais pesados e efetuar registos de entrada dos lotes de cortiça, identificando a região, a floresta ou a propriedade, as quantidades, o ano de tiradia, entre outras, são exemplos de algumas práticas obrigatórias do CIPR (C. E. Liège, 2011).

Na A&I, a criação de métodos e estratégias de descontaminação da cortiça já vem sendo uma prioridade, desde o fim dos anos 90. Ao longo destes cerca de 15 anos, desenvolveram-se tecnologias como a Vaporização, o INOS II[®], o ROSA[®] e o ROSA *Evolution*[®], sendo que as três últimas se encontram patenteadas desde 2001, 2004 e 2007, respetivamente. Na Tabela 4, pode-se consultar mais informações sobre estes desenvolvimentos.

Tabela 4 - Principais tecnologias patenteadas pela A&I.

Tecnologia	Vaporização	INOS II®	ROSA®	ROSA Evolution®
Aplicação	Pranchas de cortiça	Discos de cortiça a utilizar nas rolhas técnicas	Granulados de cortiça para rolhas técnicas	Rolhas naturais
Modo de operação	As pranchas, após serem cozidas, passam por este processo que resulta, não só na extração de TCA e outros compostos voláteis, mas também na homogeneização da humidade	Processo de lavagem, onde discos são imersos em água a 70°C, e fazendo ciclos de pressão e depressão, há expansão e retração das lenticelas, permitindo que a água penetre na estrutura da cortiça	Baseia-se num processo de destilação controlada, onde o vapor e água sob pressão forçam a saída dos compostos voláteis	Processo semelhante ao ROSA®, mas com condições de operação diferentes: temperatura inferior e tempo de tratamento bastante superior
Eficiência	40-60%	60%	95%	80%

No que ao controlo da qualidade diz respeito, a A&I, até ao final dos anos 90, apenas realizava análise sensorial aleatória aos lotes de rolhas. Dada a elevada heterogeneidade da cortiça, há uma grande variação da concentração de TCA presente em rolhas do mesmo lote, pelo que é difícil obter uma amostragem que represente devidamente a sua contaminação. Assim sendo, a deteção e quantificação do TCA passou a ser realizada, através de cromatografia em fase gasosa, tendo, também, como base uma amostragem aleatória de cada lote. Este método pressupõe a maceração de conjuntos de 10 ou mais rolhas de um determinado lote em solução hidroalcoólica a 12%, sendo posteriormente a solução analisada por cromatografia gasosa (GC), envolvendo microextração em fase sólida (SPME).

As duas técnicas apresentadas anteriormente, apesar de simples e bastante eficazes apresentam, contudo, a desvantagem da heterogeneidade dos lotes. Assim sendo, a mais recente tecnologia implementada na A&I, a Máquina de Deteção Individual (MDI), tem como objetivo detetar individualmente a concentração de TCA em rolhas de cortiça natural sem degradar as suas propriedades. Este equipamento, capaz de operar autonomamente, apresenta eficiências na ordem dos 100% para rolhas com concentrações de TCA acima dos 5 ng/L e de 96% para concentrações acima dos 2 ng/L (Costa, 2012). Este equipamento está

dotado de um sistema de deteção por cromatografia em fase gasosa por captura de eletrões (GC-ECD), sendo capaz de analisar e separar as rolhas contaminadas das não contaminadas. A MDI é composta por 48 câmaras de incubação, um cromatógrafo contendo oito colunas cromatográficas, alimentação autónoma e deteção controlada por *software*. Os resultados promissores deste equipamento deram origem a um aumento das exigências por parte dos clientes, às quais a A&I decidiu corresponder. Neste momento, estão a ser implementadas medidas de otimização deste equipamento com vista a reduzir o tempo de análise para os 16 s/rolha e o limite de deteção para 0,5 ng/L (Guimarães, 2015).

As medidas implementadas pela A&I nas duas últimas décadas, estão sistematizadas na Figura 3.

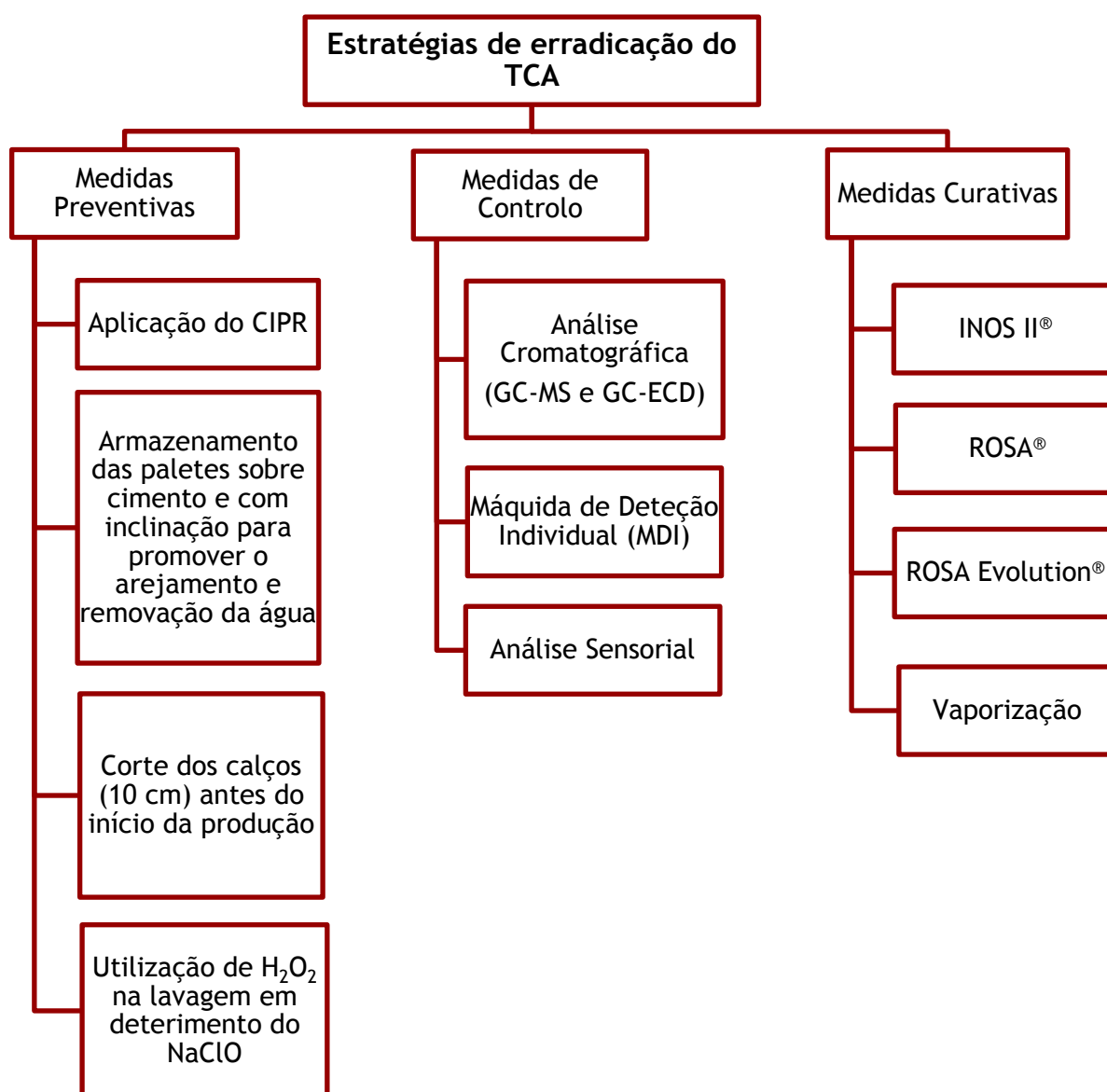


Figura 3 - Ações e tecnologias desenvolvidas e implementadas pela A&I no combate ao TCA.

Várias empresas do setor corticeiro também desenvolveram metodologias, processos e equipamentos na tentativa de erradicar o TCA dos seus produtos e processos. Segundo o Instituto de Engenharia e Tecnologia Industrial (INETI), existem 691 patentes registadas em todo o mundo relacionadas com a cortiça, sendo que 115 dizem respeito a rolhas de cortiça e 99 a tecnologias, processos e equipamentos (APCOR, 2010). Todos estes desenvolvimentos a nível mundial contribuíram para uma diminuição do TCA presente em rolhas naturais em cerca de 95% (Figura 4).

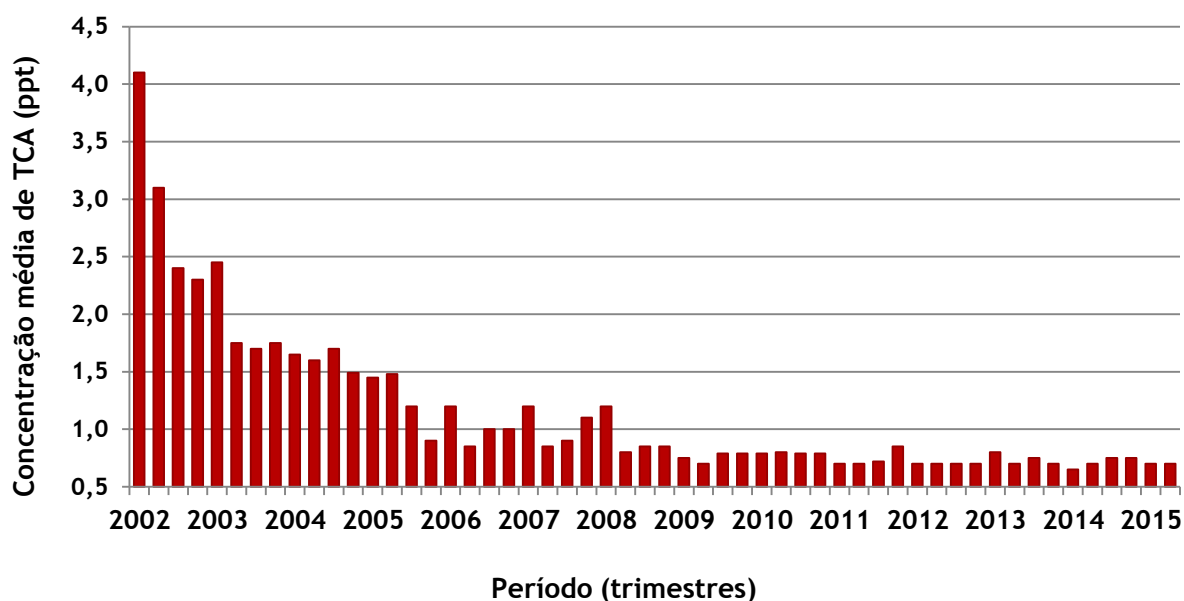


Figura 4 - Evolução da concentração de TCA presente em rolhas de cortiça natural (Adaptado de The Cork Quality Council, 2015).

1.5 Contributos do trabalho

O TCA é tido como o principal responsável pela contaminação do vinho, pelo que é fundamental para a indústria corticeira perceber a partir de que concentrações esse composto afeta os seus clientes. Este trabalho permitiu perceber quais os limites de deteção sensorial de TCA em diferentes vinhos, com diferentes proveniências. Conhecer estes valores é fundamental, uma vez que devem ser tidos como metas a alcançar pelo equipamento de deteção individual (MDI), que é considerado como o equipamento que revolucionará a forma de operar da A&I no que à deteção de TCA em rolhas naturais diz respeito.

Por outro lado, a realização deste trabalho permitiu perceber que, apesar de o TCA ser o composto central no que diz respeito à contaminação das rolhas, existem outros compostos que podem prejudicar o vinho. Se a superfície da rolha estiver contaminada e em contacto com o vinho, este pode sofrer alterações organoléticas que podem levar à sua rejeição. Assim, é fundamental perceber que outros contaminantes podem afetar a qualidade de um vinho e de que forma.

1.6 Organização da tese

Esta tese encontra-se estruturada em seis capítulos.

No primeiro, Introdução, faz-se um enquadramento do problema em estudo, introduz-se a empresa, faz-se uma abordagem à cortiça e aos seus principais contaminantes e, finalmente, é feita uma análise às práticas e tecnologias que têm vindo a ser desenvolvidas para tentar eliminar o TCA como contaminante da rolha e do vinho.

O segundo capítulo, Estado da Arte, aborda a importância do estudo dos contaminantes da rolha de cortiça natural, dando conta das investigações de maior relevo realizadas até à data sobre esta temática.

No terceiro capítulo, Descrição Técnica, são explanadas as metodologias utilizadas, apresentando os métodos e técnicas desenvolvidas e aplicadas ao longo deste trabalho.

O quarto capítulo, Discussão dos Resultados, é dedicado à exposição dos resultados obtidos e consequente análise dos mesmos.

O quinto capítulo dá conta das principais conclusões do projeto, tendo como base os resultados obtidos.

Por último, o capítulo seis é dedicado à avaliação do trabalho desenvolvido, onde se faz o levantamento dos objetivos concretizados, das limitações e trabalho futuro.

2 Contexto e Estado da Arte

As propriedades únicas da cortiça - impermeabilidade, leveza, facilidade de compressão, resistência à decomposição e inércia química - fazem da rolha de cortiça natural o vedante de eleição de uma garrafa de vinho. Tal acontece, uma vez que a rolha de cortiça protege o vinho contra variações de temperatura e impede que este se deteriore com o tempo, já que cada rolha de cortiça é composta por cerca de 800 milhões de minúsculas células preenchidas com ar (Fortes *et al.*, 2004). A cortiça previne a deterioração organolética do vinho durante o estágio na garrafa e possui, ainda, a capacidade de se adaptar ao formato do gargalo da garrafa, impedindo o vinho de verter (Azevedo *et al.*, 2014). No entanto, esta investigadora, bem como outros (Karbowski *et al.*, 2010; Godden *et al.*, 2005) alertam para o facto de a rolha de cortiça transmitir oxigénio e compostos voláteis e não voláteis ao vinho, o que permite uma evolução organolética harmoniosa e equilibrada dos vinhos durante o período de conservação em garrafa.

A produção de rolhas de cortiça é um processo bastante complexo, pelo que exige controlo de qualidade nas diversas fases de produção. A inocuidade da rolha de cortiça, a eficiência dos processos produtivos e a obtenção de rolhas com as funcionalidades adequadas para servirem de vedantes para vinhos ou bebidas espirituosas são os principais objetivos do controlo de qualidade no fabrico de rolhas de cortiça.

Como medidas de controlo da qualidade, estão implementados na A&I equipamentos que fazem uso da cromatografia para identificar e quantificar não só TCA, mas também outros compostos presentes nas rolhas. Para ser possível a análise por cromatografia gasosa (GC) com espetrometria de massa (MS) ou captura de eletrões (ECD) é necessário fazer uma maceração individual em solução hidroalcoólica a 12% (v/v), de forma a simular o vinho, e aguardar 24h para que se atinja o equilíbrio entre o composto presente na superfície da rolha e a solução (Riboulet *et al.*, 2002). A utilização destes equipamentos permite que seja realizada análise a vários compostos contaminantes de rolhas. Já a MDI foca-se, exclusivamente, na deteção e quantificação de TCA em rolhas de cortiça natural e não exige que seja feita a maceração das rolhas que se pretende estudar. Este projeto, desenvolvido desde 2008, tem sofrido várias alterações, no sentido de otimização procedimentos e maior eficiência. Como já foi referido anteriormente, os esforços, neste momento, passam, maioritariamente, por diminuir os limites mínimos de deteção de TCA (Ld) com uma eficácia que ronde os 100%. Para otimizar o Ld é necessário conhecer qual o limiar de deteção

sensorial (LD) dos clientes da A&I, ou seja, as caves produtoras e comercializadoras de vinho. Nesta sequência, torna-se pertinente realizar provas sensoriais para determinar o LD em diferentes vinhos, com diferentes constituições e proveniências. Vários estudos foram realizados, procurando conhecer os LD e os limiares de rejeição sensorial (LR) em diferentes vinhos (Tabela 5). O LD corresponde ao limiar no qual o consumidor deteta um desvio sensorial e gustativo do vinho, contudo não consegue identificar claramente de que desvio se trata. O LR corresponde ao limiar no qual o consumidor percebe claramente qual o desvio que está presente no vinho e, por isso, o rejeita.

Tabela 5 - Valores obtidos para LD e LR de TCA em diferentes vinhos.

LD (ng/L)	LR (ng/L)	Vinho	Painel	Referência
1,4		Pinot noir	Especialistas	Duerr, 1985
1,5	4,2	Vinho branco	Especialistas	Thevenet <i>et al.</i> , Não datado
4		Vinho branco	Especialistas	Amon <i>et al.</i> , 1989
2	6	Vinho branco (Franzia)	Especialistas	Hervé <i>et al.</i> , 2004
1		Vinho branco (Semillon)	Especialistas	Francis <i>et al.</i> , 2003
2,1	3,1	Vinho branco (Chardonnay)	Consumidores experientes	Prescott <i>et al.</i> , 2005
3,0		Vinho branco e tinto	Especialistas	Chatonnet <i>et al.</i> , 2004

Um estudo realizado pelo *International Wine and Spirit Research* indica que o consumo de vinho tem vindo a aumentar (International Wine and Spirit Research, 2014), o que torna os consumidores mais sensíveis e exigentes quanto à qualidade do vinho. Apesar de todos os estudos que já foram realizados no sentido de determinar o LD e o LR, as informações sobre os vinhos utilizados e as condições de operação em que decorreram são escassas. Tendo em conta os dois pontos anteriores, torna-se necessário prosseguir com o estudo da determinação do LD e LR em diferentes tipos de vinho.

Retomando o controlo rigoroso que é feito à qualidade das rolhas de cortiça natural, os produtos acabados, para que complementem as normas internas das adegas, são sujeitos a testes laboratoriais como, por exemplo, o controlo do teor de humidade, análise visual, controlo das dimensões, análise microbiológica, capacidade de vedação e a análise sensorial (APCOR, 2015).

A análise sensorial tem como objetivo o auxílio do desenvolvimento, otimização e garantia da qualidade das rolhas. A rolha de cortiça, sendo um produto de embalagem, deve ser inócua do ponto de vista sensorial, ou seja, não deve interferir com as propriedades do vinho que vai engarrafar (Moutinho, 2008). A ISO 22308:2005, aplicável a todos os tipos de rolhas de cortiça prontas a usar e destinadas a estar em contacto com bebidas alcoólicas, define um método para a deteção, caracterização e avaliação de eventuais odores e/ou sabores presentes nas rolhas (ISO, 2005).

Apesar de todas as estratégias desenvolvidas pela indústria corticeira com o objetivo de erradicar os possíveis contaminantes da cortiça, e em particular o TCA, estima-se que cerca de 80% dos casos de contaminação com “aroma a mofo” são da responsabilidade deste cloroanisol (Sefton e Simpson, 2005). Todavia, pode-se considerar este valor um pouco “inflacionado”, já que foi o primeiro contaminante a ser identificado em meados dos anos 80 e foi, durante vários anos, considerado o único contaminante da cortiça. Os mesmos autores admitem, porém, a existência de outros compostos contaminantes da cortiça que são suscetíveis de degradar a qualidade sensorial do vinho, contudo sem saberem bem de que forma. De toda a panóplia de compostos considerados como sendo provenientes da cortiça, os autores destacam o MDMP, o IPMP, o MIB, o guaiacol, o oct-1-en-3-ol, o 1-octen-3-ona e a geosmina. Estes contaminantes podem afetar negativa ou positivamente os vinhos, dependendo quer da sua natureza, quer da respetiva quantidade presente na rolha.

Os estudos acerca da contaminação sensorial de rolhas naturais encontram-se, essencialmente, focados no TCA (Macku *et al.*, 2009). Daí que é determinante perceber que outros compostos prejudicam o aroma natural das rolhas e cortiça e qual a sua incidência. Para isso é necessário recorrer à análise sensorial que pode ser realizada por dois métodos de análise individual de rolhas: a “maceração” a seco e a maceração em líquido, usando solução etanólica, vinho ou água. A “maceração” a seco é um método que, para além de não destruir a rolha, é bastante simples e rápido de preparar, contudo apresenta maior dificuldade na identificação dos defeitos sensoriais, pelo que exige muito treino por parte dos provadores. Já a maceração em líquido é um método que permite uma caracterização mais fácil e precisa da qualidade do lote, no entanto representa um maior volume de trabalho e inviabiliza a

utilização futura da rolha, que tem de ser reciclada. A maceração em líquido pode ser realizada em água, solução hidroalcoólica a 12% (v/v) ou em vinho, contudo a deteção e identificação dos contaminantes é mais simples em água já que não existem outros compostos para além dos presentes na rolha a interferir no aroma da solução (Franson, 2010; Chatonnet *et al.*, 2004).

Na sequência de tudo o que foi explanado, o presente trabalho dividiu-se em dois principais objetivos. O primeiro prendeu-se com a determinação dos LD e LR em diferentes vinhos (brancos, tintos, espumantes e vinhos do Porto) com diferentes características e proveniências. Com o segundo objetivo, pretende-se estudar a incidência de diferentes contaminantes em rolhas de cortiça. Para alcançar este objetivo, foi necessário subdividi-lo em três objetivos específicos. O primeiro diz respeito à comparação dos dois métodos de análise sensorial individual: “maceração” a seco e maceração líquida em água; o segundo reporta-se à identificação e quantificação, por cromatografia, dos compostos contaminantes presentes nas rolhas de cortiça natural analisadas; e por fim, pretendeu-se realizar um engarrafamento com estas rolhas contaminadas e proceder ao estudo do vinho em diferentes momentos temporais.

3 Descrição técnica

3.1 Determinação dos limiares de deteção e de rejeição do TCA em diferentes tipos de vinho

Para a realização das provas de vinhos na CVRVV constituiu-se um painel de seis provadores especializados, recrutados a partir do painel permanente da CVRVV e do Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (IVDP). Ao longo das cinco sessões de análise sensorial, foram provados 14 vinhos diferentes, contando, no mínimo, com a presença de três provadores e no máximo de seis. Três dos provadores realizaram todas as provas sensoriais.

Em cada sessão, utilizaram-se vinhos que se encontravam contaminados com concentrações de TCA conhecidas e crescentes: 0,5 ng/L; 1 ng/L; 2 ng/L; 4 ng/L; 8 ng/L e 16 ng/L. As provas pressupunham que cada provador, face a um conjunto de três copos (numerados com codificação aleatória), percebesse quais os copos contaminados e os de controlo (teste triangular) e identificasse os seus preferidos (teste de pares). Para as seis concentrações estudadas assegurou-se o cumprimento de todas as combinações possíveis na disposição dos copos contaminados e dos não contaminados. Todas as sequências foram apresentadas o mesmo número de vezes e de forma aleatória.

Para melhor se perceber os procedimentos adotados neste processo, apresenta-se, na Figura 5, um excerto de uma folha de prova. Na mesma sessão, as provas foram espaçadas por períodos de repouso de cerca de 10 minutos.

Série 1		
Tem três amostras numeradas, das quais duas são idênticas e a terceira é diferente. Assinale a amostra que considera diferente.		
296	598	263
Descreva a diferença encontrada:		Qual a amostra preferida? _____

Figura 5 - Excerto da folha de prova utilizada nas provas de vinho.

Em todas as provas, realizadas no período da manhã, o volume de cada uma das amostras foi de cerca de 30 mL. As amostras foram servidas em copos de vidro XL5 (Figura 6), de dimensões de acordo com a norma ISO 3591 que permitem a concentração dos aromas presentes no vinho e tapadas com vidros de relógio. A sala de prova encontrava-se à temperatura de $17\pm 1^{\circ}\text{C}$ e as amostras foram provadas sob ponto de vista quer olfativo, quer gustativo. Todas as provas foram realizadas numa sala de prova com lugares individuais para os vários membros do painel.

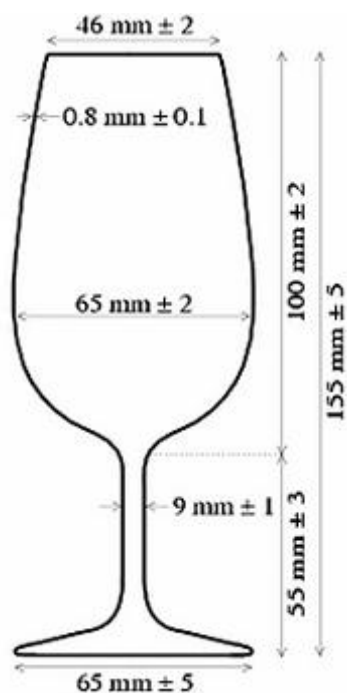


Figura 6 - Esquema do copo utilizado nas provas de vinhos.

Na Tabela 6, encontram-se as informações relativas aos vinhos utilizados em todas as sessões e as propriedades químicas de alguns deles encontram-se no Anexo 1.

Tabela 6 - Informações relativas aos vinhos usados nas provas sensoriais.

Marca	Região	Ano	Castas	Teor alcoólico (% v/v)
Le Tose (Prosecco)	Itália, Conegliano, Valdobbiadene	Lote	Glera	11
Bernard Robert (Champagne)	França, Champagne, Côte des Bar	2010	Pinot Noir, Chardonnay e Pinot Meunier	12
Herbert Bretz (Vinho Branco)	Alemanha, Rheinhessen	2013	Riesling	13
Cuvée Saint-Vincent (Vinho Branco)	França, Bourgogne, Meursault	2012	Chardonnay	13
Beaujolais Nouveau (Vinho Tinto)	França, Beaujolais	2014	Gamay	12
Château Roquefort Rouge (Vinho Tinto)	França, Bordéus	2013	Merlot e Cabernet Sauvignon	13,2
Domaine Cheillon- Chezeaux (Vinho Tinto)	França, Bourgogne	2013	Pinot Noir	12,5
Château D'Aurilhac (Vinho Tinto)	França, Bordéus, Médoc	2010	Merlot Noir, Cabernet Sauvignon, Petit Verdot e Cabernet Franc	14
St. Hallett (Vinho Tinto)	Austrália, Barossa	2013	Shiraz	14
J. Lohr (Vinho Tinto)	Paso Robles, Califórnia	2012	Cabernet Sauvignon	13,5
Louis M. Martini (Vinho Tinto)	Sonoma County, Califórnia	2013	Cabernet Sauvignon	13,8
Porto Branco (Vinho do Porto)		Lote		20
Porto Tawny (Vinho do Porto)		Lote		20
Porto Ruby (Vinho do Porto)		Lote		20

Os resultados obtidos para cada vinho foram tratados estatisticamente onde se compararam dois métodos: o método da distribuição binomial e o *Best Estimate Threshold* (BET).

O método de distribuição binomial implica o uso de tabelas de distribuição binomial. Ou seja, face ao número de provadores determina-se o número mínimo de respostas corretas necessárias para um critério de significância de 95% ($p = 0,05$) e de 99% ($p = 0,01$) recorrendo à tabela binomial. Com base no número de respostas corretas obtidas verifica-se se há diferenças estatisticamente significativas e qual a proporção de provadores que preferiu a amostra diferente. Para determinar o LD por este método faz-se, então, uma interpolação entre a concentração para a qual todos os provadores detetam a presença de TCA e o valor anterior. Para determinar o LR por este método faz-se uma interpolação entre a concentração para a qual todos os provadores preferem as amostras controlo e o valor anterior.

O método BET consiste no cálculo da média geométrica dos resultados obtidos pelo grupo de provadores. Para determinar o LD por este método analisam-se individualmente os resultados de cada provador e no fim faz-se a média geométrica de todos os valores. Para obter o LR o procedimento é o mesmo.

3.2 Incidência de diferentes contaminantes em rolhas de cortiça

3.2.1 Comparação de dois métodos para realização de análise sensorial

Para determinar os compostos responsáveis por aromas indesejáveis presentes em rolhas naturais, compararam-se dois métodos, um dos quais a “maceração” a seco. Este método consiste na “maceração” individual de conjuntos de 100 rolhas, ou seja, colocou-se uma rolha por frasco com a capacidade de 150 mL na presença de 60 µL de água, tapados e ficando a repousar durante 24h à temperatura ambiente. Após 24h, realizou-se uma análise sensorial descritiva onde, cada provador tentou determinar se existia um aroma desviante em cada uma das 100 rolhas e, em caso afirmativo, atribui-lhe um descritor. A análise sensorial foi

feita diretamente dos frascos que se encontravam numerados. Foi necessário que, pelo menos, três provadores realizassem a prova, pelo que entre cada análise houve um intervalo de, no mínimo, 30 minutos para estabilização do contaminante no ambiente no frasco.

O outro método utilizado no decorrer deste projeto consistiu na maceração líquida de conjuntos de 100 rolhas em frascos de 150 mL cheios até ao topo (sem *headspace*) com água destilada, ficando tapados e em repouso durante 24h à temperatura ambiente. Após 24h o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente, contudo a análise sensorial foi realizada a partir de copos, já que se verteu a água de cada frasco numerado para o copo correspondente.

Para comparar os dois métodos, depois de realizada a prova sensorial por “maceração” a seco, a mesma rolha foi macerada em água, sendo esta de seguida, analisada sensorialmente por um painel com experiência na realização de provas sensoriais. A partir do nono lote, analisaram-se cromatograficamente as águas das macerações das rolhas consideradas como tendo TCA de forma a confirmar os resultados obtidos nas provas sensoriais.

Nesta parte do trabalho foram analisados 14 lotes, cedidos pela unidade industrial Amorim & Irmãos e cujas características se encontram no Anexo 2.

No sentido de validar o estudo, ao proceder ao tratamento dos resultados foi necessário o consenso de, pelo menos, três provadores quanto à classificação aromática de uma dada rolha. Só assim essa rolha poderia ser incluída numa determinada família de aromas.

3.2.2 Rolhas sensorialmente triadas

Na tentativa de obter rolhas contaminadas sensorialmente, foram analisadas rolhas naturais de diferentes classes e submetidas a diferentes processos de *lavagem* (Tabela 7). As rolhas, que tinham sido previamente analisadas sensorialmente e consideradas como contaminadas, foram cedidas pela unidade industrial Amorim Distribuição (AD), sendo provenientes de diferentes lotes. Para facilitar o estudo, as rolhas foram todas numeradas.

Tabela 7 - Características das rolhas analisadas sensorialmente.

<i>Calibre* (mm x mm)</i>	<i>Classe</i>	<i>Lavação**</i>
45x26	C	<i>Clean C</i>
39x26	B	<i>Light</i>
45x24	B	<i>Light</i>
45x24	C	<i>Clean C</i>
45x24	A	<i>Light</i>
45x24	C	<i>Light</i>
49x24	C	<i>Light</i>

*O calibre corresponde ao comprimento da rolha x diâmetro da rolha, sendo que cada uma das dimensões é expressa em milímetros.

**A *lavação* consiste na lavagem de rolhas de cortiça utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio. Esta operação destina-se a assegurar a limpeza, despoeiramento e desinfeção das rolhas.

A análise sensorial foi feita por “maceração” a seco, cujo procedimento se encontra descrito no subcapítulo 3.2.1, e agruparam-se as rolhas contaminadas em cinco famílias de aromas com os respetivos descritores (Tabela 8). Apesar de existirem diversos descritores, como está representado na Figura 1, na tabela seguinte apresentam-se somente aqueles que foram relevantes para o presente estudo.

Apesar de o TCA ser geralmente descrito como mofo, pretendeu-se distinguir o aroma a TCA dos aromas não relacionados com ele, separando estes últimos para o grupo de descritores “mofo”. Algumas das rolhas que não continham desvios sensoriais foram separadas para virem a ser utilizadas posteriormente como rolhas referência nos diferentes ensaios. Acrescentou-se uma família de aromas à qual se chamou “outros” que engloba as rolhas cujos descritores sensoriais não foram consensuais.

Tabela 8 - Família de aromas e descritores mais frequentes.

Família de aromas	Descritor
Mofo	Terra Cogumelos Musgo
TCA	TCA
Vegetal	Pimento verde Erva
Químico	Farmacêutico Metálico
Decomposição	Podre Chulé Água estagnada

3.2.3 Identificação de contaminantes em rolhas de cortiça por SPME GC-MS

Algumas rolhas (nove) classificadas como contaminadas sensorialmente com aromas relacionados com o mofo foram maceradas individualmente em solução hidroalcoólica a 12% (v/v), sem *headspace*, sendo deixadas em repouso durante 24h para permitir que se estabelecesse o equilíbrio entre o contaminante e a solução. Após esse tempo retirou-se uma amostra para análise, usando o equipamento GC-MS, cujas características se encontram no Anexo 3.

O método utilizado neste estudo já se encontrava implementado no I&D, porém sem ser usado há cerca de três anos, pelo que foi necessário verificar se o equipamento conseguia detetar todos os compostos que se pretendia analisar, já que nesse espaço de tempo sofreu várias intervenções. Foram realizados, assim, estudos, calibrações e otimizações de forma a compreender o comportamento da geosmina, do MIB, do guaiacol e do oct-1-en-3-ol. Utilizou-se 2,4,6-tricloroanisol deuterado (d_5 -TCA) e 4-etilguaiacol deuterado (d_5 -4EG) como padrões

internos, tendo sendo sido necessário estudar também os seus comportamentos. As condições de operação do método otimizado encontram-se detalhadas no Anexo 4.

Neste método, as amostras introduzidas no GC-MS foram analisadas e quantificadas em modo SIM (*Single Ion Monitoring*). Para cada composto que se pretendia detetar e quantificar foi necessário obter uma reta de calibração. Para a calibração do método prepararam-se vários padrões com concentrações crescentes conhecidas do mesmo composto e todos foram analisados nas mesmas condições. Posteriormente elaborou-se um gráfico de calibração onde se relacionou o sinal do equipamento e a respetiva concentração. A concentração dos compostos nas amostras foi obtida por interpolação na reta de calibração. As retas de calibração (constituídas por nove pontos) obtidas para estes compostos e as informações relativas aos parâmetros da análise encontram-se no Anexo 5.

Depois de o equipamento estar calibrado para quantificar os compostos acima mencionados foi realizado um estudo para determinar os limites de quantificação do equipamento para cada contaminante. Para isso prepararam-se 10 réplicas de cada padrão constituinte da reta de calibração de forma a garantir a precisão intermédia dos resultados. A metodologia utilizada encontra-se detalhada no Anexo 6.

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação dos limiares de detecção e de rejeição do TCA em diferentes tipos de vinho

O primeiro objetivo consistiu em determinar os limiares de detecção (LD) e de rejeição (LR) de TCA em diferentes vinhos, com proveniências de várias partes do mundo e com propriedades e constituições variadas. A contaminação de vinhos com TCA a partir dos valores de LD ou LR podem sensorialmente penalizar os vinhos, pelo que a sua determinação é essencial tanto para a indústria vitícola, como para a indústria corticeira.

Recorreu-se, para isso, a um painel bastante experiente em provas de vinho, constituído por elementos que integram o painel permanente da CVRVV e do IVDP. Em cada uma das cinco sessões realizadas na CVRVV foram provados, tanto de um ponto de vista sensorial como gustativo, três vinhos com características e proveniências diferentes. O número de provadores inicialmente previsto para todas as provas foi de seis elementos, porém nas sessões 2, 3, 4 e 5 sucederam-se imprevistos que não permitiram a comparência de todo o painel estipulado inicialmente. No entanto, três dos provadores compareceram a todas as provas. Os provadores utilizados neste estudo, apesar de em número reduzido, têm uma elevada experiência em provas de vinhos, o que é fundamental no âmbito deste projeto. Essa especialização é crucial, já que representa a elevada qualidade de provadores que se encontram nas cavas produtoras de vinho, que são os principais clientes da A&I.

Para se determinar o LD e o LR usou-se uma folha de prova como a que se encontra na descrição técnica, de onde se recolheu toda a informação.

Os resultados obtidos tanto pelo método binomial, como pelo BET estão apresentados na Tabela 9. No Anexo 7 encontram-se os valores obtidos para todos os vinhos que permitiram a elaboração desta tabela.

Tabela 9 - Limiares de deteção (LD) e rejeição (LR) de TCA para os diferentes vinhos.

Bebida	Distribuição binomial		BET (Best Estimate Threshold)		Número de provadores
	LD (ng/L)	LR (ng/L)	LD (ng/L)	LR (ng/L)	
Prosecco (Conegliano, Itália)	1	2	0,6	0,6	6
Chardonnay (Borgonha, França)	1,5	2	0,8	1	
Shiraz (Barossa, Austrália)	4	16	2,5	2,5	
Riesling (Rheinhessen, Alemanha)	1	1	0,6	0,6	3
Beaujolais Nouveau (Beaujolais, França)	1	1	1,1	1,1	
Assemblage (Bordéus, França)	4	4	1,3	1,4	
Champagne (Champagne, França)	1,5	4	0,7	0,7	5
Pinot Noir (Borgonha, França)	2	4	1	1	
Assemblage (Bordéus, França)	1	4	1	1	
Cabernet Sauvignon (Paso Robles, Califórnia)	2	2	1,1	1,1	4
Cabernet Sauvignon (Sonoma, Califórnia)	1	1	0,6	0,6	
Porto Branco	8	8	1,8	1,8	3
Porto Tawny	4	4	3,6	3,6	
Porto Ruby	4	4	1	1	

Os limiares de deteção e de rejeição de TCA encontrados para os vinhos tintos foram superiores aos obtidos para os vinhos brancos e espumante. A matriz muito mais complexa daqueles vinhos justifica estes resultados. Já os vinhos do Porto apresentaram, em geral, LD superiores quando comparados com os restantes vinhos, já que este é um tipo de vinho com uma quantidade de álcool muito superior, o que dificulta a deteção de odores indesejáveis e, neste caso, de TCA.

Como esperado, os limiares de rejeição são, de uma forma geral, superiores do que os limites de deteção. Este facto é resultado da fácil deteção da alteração organolética de um vinho mas da muito mais difícil descrição da alteração encontrada.

No que diz respeito aos limiares de deteção, eles foram muito baixos e muito próximos dos limites de quantificação cromatográfica, o que pode ser justificado pelo uso de provadores profissionais para a sua determinação. Parece evidente que o consumidor não conseguirá atingir tais limites, contudo a intenção da A&I foi tentar encontrar estes limites no pior cenário possível, para que, no controlo de TCA, não sejam aprovadas rolhas que possam vir a ser consideradas positivas pelos clientes, que, neste caso, também são profundamente conhecedores das características sensoriais do vinho que produzem. Só assim a A&I conseguirá chegar à garantia de TCA não detetável nas rolhas de cortiça que vende.

Os resultados obtidos para o limiar de deteção de 0,6 ng/L a 4 ng/L, devem ser tidos em conta no controlo de TCA das rolhas feito na A&I. Assim, o limite de deteção de 0,5 ng/L, que é pretendido atingir na MDI, é essencial para o sucesso deste equipamento, pois valores limite de 5 ng/L ou de 2 ng/L como as atuais máquinas apresentam, não são suficientes para responder às exigências dos clientes.

4.2 Incidência de diferentes contaminantes em rolhas de cortiça

A partir de rolhas de produção normal ou de rolhas previamente triadas por uma unidade industrial da A&I, foi determinada a incidência dos contaminantes responsáveis por desvios sensoriais que podem interferir negativamente na qualidade sensorial dos vinhos. Dado que as rolhas de produção normal e as previamente triadas sensorialmente foram tratadas de forma diferente, os resultados obtidos para cada um dos grupos serão apresentados separadamente.

4.2.1 Comparação de dois métodos para realização de análise sensorial

Neste capítulo, foi determinada a incidência de compostos responsáveis por desvios sensoriais, que não pertencem à matriz sensorial característica da cortiça e foi feita a tentativa de os classificar quanto ao aroma de acordo com a Roda de Aromas.

Ao longo de vários meses analisaram-se, do ponto de vista sensorial, 14 lotes de rolhas, o que corresponde a 1400 rolhas. A análise sensorial foi concretizada recorrendo aos métodos “maceração” a seco e maceração em água, num exercício que visava perceber se os resultados obtidos pelos dois métodos poderiam ser considerados semelhantes ou se, pelo contrário, havia diferenças entre eles.

Cada lote de rolhas foi estudado individualmente e, de forma a dar validade ao estudo, numeraram-se todas as rolhas (de cada lote) de 1 a 100. A numeração das rolhas foi feita com o intuito de perceber se os provadores encontrariam os mesmos defeitos sensoriais nas mesmas rolhas pelos dois métodos. Numa primeira fase os provadores analisaram sensorialmente as rolhas de cada lote por “maceração” a seco e, posteriormente após maceração em água. Como já foi referido noutros capítulos, englobaram-se os descritores encontrados ao longo das provas em cinco famílias: TCA, mofo, químico, vegetal e decomposição. O painel de provadores que realizou todas as provas é considerado inexperiente, pelo que, em alguns casos, para um mesmo defeito sensorial, se atribuíram diferentes designações, não ocorrendo um consenso em termos de classificação sensorial. Assim, dadas as circunstâncias, acrescentou-se uma nova família de aromas que englobasse esses casos, designada por “outros”, apenas para o tratamento dos resultados.

A Tabela 10 condensa os resultados obtidos para cada lote e foi elaborada de forma a ser possível realizar uma comparação direta entre os dois métodos.

Tabela 10 - Resultados comparativos da utilização dos dois métodos de análise sensorial.

Lote \ Descritor	“Maceração” a seco						Maceração em água					
	TCA	Mofo	Químico	Vegetal	Decomposição	Outros	TCA	Mofo	Químico	Vegetal	Decomposição	Outros
1	1 * (45) **		2 (18, 23)			2 (32, 100)	1 (45)	1 (26)			1 (52)	
2						1 (8)	2 (6, 30)	1 (8)				
3	1 (37)			1 (46)			1 (37)					4 (2, 4, 15, 84)
4		1 (57)	1 (81)				2 (18, 32)				4 (45, 46, 79, 83)	1 (91)
5	1 (7)		2 (82, 95)	1 (73)	1 (69)	1 (47)	1 (76)	2 (55, 83)	2 (42, 45)	1 (74)		4 (21, 25, 30, 39)
6	1 (76)	1 (83)				1 (27)			2 (22, 80)		1 (70)	
7	1 (93)			1 (17)			3 (23, 66, 93)			2 (17, 50)	1 (40)	4 (9, 15, 70, 85)
8		1 (76)		1 (12)		2 (28, 34)	2 (57, 58)			2 (19, 38)	1 (12)	4 (27, 56, 76, 92)
9	2 (66, 18)				1 (98)		2 (66, 18)			1 (49)	1 (16)	
10	2 (59, 77)						2 (59, 77)					
11	2 (10, 29)						2 (10, 29)		1 (23)			
12							2 (75, 86)				2 (35, 52)	1 (90)
13	2 (7, 61)						2 (7, 61)					
14					1 (15)		1 (67)		1 (37)		1 (15)	
Incidência	0,9%	0,2%	0,4%	0,3%	0,2%	0,5%	1,6%	0,3%	0,4%	0,4%	0,9%	1,3%

*Quantidade de rolhas com o descritor, **Identificação da(s) rolha(s) com defeito(s)

A Tabela 10 engloba diferentes informações que vale a pena clarificar: analisando a informação de cada lote (linhas), é possível perceber quantas rolhas se atribuíram a cada família de aromas e identificar quais as rolhas que correspondem a esses desvios. A título de exemplo: no lote 1, usando a “maceração” a seco, classificou-se uma rolha como “TCA” (rolha número 45), duas como “químico” (rolhas 18 e 23) e duas como “outros” (rolhas 32 e 100); enquanto pela maceração em água classificou-se uma rolha como “TCA” (rolha 45), uma como “mofo” (rolha número 26) e uma como “decomposição” (rolha 52). Este condensamento de informação teve como objetivo dar a conhecer, não só a quantidade de rolhas por lote classificadas com um certo desvio, mas também, referir se os desvios sensoriais foram atribuídos às mesmas rolhas. Podemos, ainda, fazer uma leitura na vertical (colunas) para analisar quantas rolhas no total do estudo foram classificadas com as seis famílias de aromas. A incidência refere-se à quantidade de rolhas, em percentagem, que foram classificadas com determinado desvio. Como exemplo: por “maceração” a seco caracterizaram-se 13 rolhas como contendo aroma a TCA nas 1400 estudadas, o que corresponde a uma incidência de 0,9%; enquanto por maceração em água caracterizaram-se 23 rolhas como TCA, o que corresponde a uma incidência de 1,6%. Pode-se, finalmente, perceber quais as rolhas que obtiveram a mesma classificação nos dois métodos, já que estas se encontram salientadas a vermelho. Das 13 rolhas que se encontram destacadas, 11 correspondem a TCA, uma a vegetal e uma a decomposição.

O aumento do número de rolhas com descritores associados à decomposição na maceração individual em água é expectável. A presença de água, aliada à temperatura amena da sala de análise sensorial ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), favorece a extração de aromas a decomposição (produzidos pela atividade microbiológica de microrganismos, em particular fungos)

O descritor “outros”, é um dos mais frequentes e pode ser explicado tendo em conta a inexperiência do painel de provadores. Como na maceração em água é mais fácil a deteção da presença de compostos sensorialmente desagradáveis explica-se, assim, o aumento do número de rolhas com esta classificação face à “maceração” a seco.

A partir do nono lote, após a realização da análise sensorial por maceração líquida, foram analisadas por SPME GC-ECD as águas das macerações das rolhas consideradas como tendo TCA. Todas confirmaram a presença deste cloroanisol. Das onze rolhas analisadas três apresentavam concentrações entre 0,5 ng/L e 1 ng/L, três apresentavam concentrações entre 1 ng/L e 5 ng/L e cinco apresentavam concentrações de TCA superiores a 5 ng/L.

As rolhas 75 e 86 do 12º lote e a rolha 67 do 14º lote correspondem às rolhas com concentrações de TCA inferiores a 1 ng/L e nos três casos não foram detetadas aquando a

realização da “maceração” a seco. Com base nestes resultados, admitiu-se que o painel de provadores que analisou sensorialmente estas rolhas apresenta um limite de deteção de TCA no método de “maceração” a seco próximo de 1 ng/L.

O total de defeitos encontrados por “maceração” a seco foi de 2,5%, enquanto por maceração em água foi de 4,9%. A aplicação da “maceração” individual a seco é vantajoso, já que não inviabiliza a rolha, é bastante simples e rápida de preparar e exige um menor gasto de recursos. Porém, apresenta maior dificuldade na identificação dos defeitos sensoriais, o que obriga a que os provadores tenham bastante prática. A maceração individual em água é um método que permite uma caracterização mais fácil e precisa da qualidade do lote, contudo representa um maior volume de trabalho e inviabiliza a utilização futura da rolha. O estudo realizado demonstrou que, apesar das diversas vantagens que a “maceração” a seco apresenta, este ainda não deve ser aplicado a quantidades muito grandes de rolhas nem a painéis com pouca experiência, pois corre-se o risco de caracterizar o lote como “Aprovado” e, na realidade, terem-se deixado escapar desvios sensoriais que o reprovavam.

4.2.2 Rolhas sensorialmente triadas

Para as rolhas que já haviam sido submetidas a triagem pelo controlo de qualidade de uma unidade industrial da A&I, foi realizada uma confirmação da presença dos contaminantes responsáveis por desvios sensoriais, através do método de “maceração” a seco. Também foi efetuada a classificação dos aromas, tendo como base a Roda de Aromas da cortiça (Figura 1).

Neste procedimento, utilizaram-se rolhas que já tinham sido rejeitadas previamente por análise sensorial de forma a assegurar a recolha de um maior número de rolhas contaminadas sensorialmente. Tal utilização resulta de outro objetivo deste trabalho: proceder ao engarrafamento de rolhas contaminadas com diferentes compostos para estudar de que forma esses contaminantes podem afetar o vinho. Estabeleceu-se como meta a separação de 50 rolhas contendo descritores associados a cada uma das famílias de aromas. Foram analisadas 381 rolhas, das quais 143 (37,5%) apresentaram desvio sensorial. Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos para cada desvio sensorial.

Tabela 11 - Resultados obtidos quanto à incidência de rolhas sensorialmente contaminadas.

Desvios sensoriais	Nº de rolhas com desvio	% de rolhas com desvio sensorial face ao total de rolhas contaminadas
TCA	37	25,9%
Mofo	22	15,4%
Vegetal	11	7,7%
Químico	11	7,7%
Decomposição	4	2,8%
Outros	58	40,6%

Os descritores associados ao TCA são dos que aparecem com maior frequência (25,9%), já que este composto apresenta valores de limiares de deteção bastante inferiores aos compostos associados a outros descritores.

O desvio sensorial “mofo” apresentou uma incidência elevada de 15,4%, provavelmente porque muitas vezes o odor a TCA é descrito como mofo. Dentro deste grupo, os descritores mais frequentes foram “mofo” e “terra”.

Na família de aroma a “vegetal”, responsável por 7,7% dos desvios sensoriais encontrados, os descritores mais frequentes foram “pimento verde”, “pimenta” e principalmente o próprio “vegetal”.

O desvio denominado como “químico” obteve uma incidência igual à do “vegetal” com 7,7%. Nesta família olfativa os descritores mais comuns foram “químico”, à semelhança da própria família, “queimado”, “borracha” e, finalmente, “couro”.

Foram encontradas rolhas associadas ao desvio sensorial “decomposição” em menor quantidade do que o vegetal ou o químico, com 2,8%. Os descritores mais frequentes foram “podre” e “chulé”.

Foi necessário acrescentar a família de aromas “outros”, já que, para um elevado número de rolhas (40,6%), o desvio sensorial presente não foi consensual entre os provadores. Este elevado número de rolhas pode ser explicado pela inexperiência dos provadores e também pela frequente difícil descrição do aroma presente fruto da mistura de aromas e/ou da presença de concentrações muito dispare de cada um deles.

As rolhas consideradas como não tendo desvios sensoriais por qualquer dos provadores, foram usadas como referência, com vista ao engarrafamento e posterior análise sensorial e química do vinho.

Pelos resultados obtidos, percebe-se a importância do descritor TCA - 37 rolhas. Todos os outros descritores aparecem referidos em menor número e muito possivelmente algumas das rolhas com outros descritores ou têm TCA presente ou são descritos por outras designações que não TCA. O TCA, dado que tem um limite de deteção muito baixo, é indiscutivelmente o defeito sensorial mais importante nas rolhas de cortiça.

Na Tabela 12, encontram-se listados os descritores mais frequentes de cada família aromática.

Tabela 12 - Lista dos descritores mais frequentes.

Família aromática	Mofo		Vegetal		Químico		Decomposição	
Descritores mais frequentes (Nº de rolhas / %)	Terra	13 / 59,1	Pimenta	2 / 18,2	Borracha	3 / 27,3	Chulé	2 / 50,0
	Mofo	19 / 86,4	Pimento Verde	7 / 63,6	Queimado	3 / 27,3	Podre	4 / 100
			Vegetal	9 / 81,8	Couro	3 / 27,3		
					Químico	5 / 45,5		

Para o mesmo defeito sensorial foram, na larga maioria dos casos, atribuídos diferentes descritores, pelo que a soma dos valores para cada família aromática não corresponde a 100%. Com a elaboração desta tabela pretendeu-se assinalar quais os descritores mais comuns dentro de cada família de aromas.

4.2.3 Identificação de contaminantes em rolhas de cortiça por SPME GC-MS

As rolhas que apresentaram aromas muito intensos e bastante consensuais para o painel de provadores foram analisadas por cromatografia gasosa. Para a realização desse estudo, foram usadas nove rolhas e foi necessário utilizar um método cromatográfico de identificação e quantificação de outros compostos que não TCA. Este método tinha sido desenvolvido no I&D há cerca de três anos mas não estava implementado em rotina, dada a reduzida incidência de outros compostos em rolhas de cortiça quando comparada com a do TCA. Assim, foi necessário perceber o ponto de situação do mesmo, já que o equipamento GC-MS tinha sido sujeito a algumas intervenções nos últimos anos. Para isso realizaram-se diferentes estudos utilizando os compostos geosmina, guaiacol, MIB e oct-1-en-3-ol.

Foi feita a calibração do equipamento para a análise dos compostos acima referidos e determinaram-se os limites de quantificação para cada um deles (Tabela 13). A análise do guaiacol mostrou-se bastante problemática, pelo que para o âmbito deste trabalho, não pôde ser devidamente quantificado.

A determinação dos limites de quantificação de um método face a vários compostos deve ser realizada nas gamas de concentração de interesse. Este procedimento justifica-se visto que é necessário ter em conta os estudos que referem os limites de deteção sensorial no vinho. Desta forma, os valores alcançados deverão ser iguais ou inferiores aos valores referidos nesses estudos. As informações relativas ao equipamento utilizado, à optimização do método, às calibrações e aos limites de quantificação encontram-se mais pormenorizadas nos Anexos 3, 4, 5 e 6, respetivamente.

Tabela 13 - Limites de quantificação do método e LD no vinho para os vários compostos.

Composto	TCA	Geosmina	Oct-1-en-3-ol	MIB
Limites de quantificação do método (ng/L)	0,5	20	10 000	100
Limites de deteção do método (ng/L)	0,2	7	3333	33
Limiares de deteção sensorial no vinho (ng/L)	0,6	50 *	40 *	55 *

*Valores retidados de Boutou e Chatonnet (2006)

Na Tabela 13, o valor de deteção de TCA no vinho diz respeito aos resultados obtidos pela autora através das provas na CVRVV e os restantes valores correspondem aos assinalados no estudo de Boutou e Chatonnet, 2006).

Os métodos desenvolvidos para a geosmina e para o oct-1-en-3-ol estão otimizados já que apresentam limites de quantificação muito inferiores aos limites de deteção no vinho. No método desenvolvido para o MIB apenas conseguiu obter valores de quantificação de 100 ng/L, significativamente superior ao valor detetado sensorialmente (55 ng/L).

As nove rolhas analisadas com o objetivo de verificar se o seu odor correspondia a algum destes quatro compostos obtiveram resultados negativos para todos eles, com a exceção de duas rolhas. Uma das rolhas estava associada ao descritor “terra”, mas ao ser analisada por cromatografia gasosa verificou-se que apresentava TCA com concentração de 77,5 ng/L. A outra rolha, também descrita como tendo aroma a terra, apresentou geosmina com 21 ng/L. Assim, verifica-se que, de facto, pode haver confusão entre o odor do TCA e o odor a mofo ou terra, pelo que é fundamental que os provadores que realizem análise sensorial, principalmente a “maceração” a seco, tenham bastante experiência. Percebe-se, ainda, que é necessário prosseguir com o estudo de outros compostos, tanto a nível sensorial como cromatográfico, de forma a determinar quais os contaminantes que efetivamente estão presentes, não só nas nove rolhas analisadas, mas em todas as que foram rejeitadas.

5 Conclusões

No âmbito deste trabalho, foram realizadas provas sensoriais na CVRVV para perceber quais os limiares de deteção de TCA de um painel de provadores especialistas. Esses valores serão tidos em conta no que diz respeito à otimização dos parâmetros de análise da MDI, que deverão garantir a deteção de TCA a valores tão baixos como 0,5 ng/L.

Ao analisar sensorialmente vários lotes, tanto por “maceração” individual a seco como por maceração individual em água, foi possível concluir que o primeiro método não apresenta a robustez necessária para ser utilizado por provadores inexperientes, nem deve ser usado quando se pretende analisar grandes quantidades de rolhas. Tal está relacionado com a quantidade inferior de defeitos encontrados no primeiro método (2,5%), face aos 4,9% detetados usando a maceração em água.

Quanto à incidência de compostos que prejudicam sensorialmente as rolhas de cortiça, confirmou-se que o TCA deve continuar a ser a principal preocupação da indústria corticeira já que se verificou a sua presença em quantidades muito superiores aos outros compostos e foi o contaminante que gerou maior consenso na sua deteção.

Quanto à identificação de outros contaminantes por SPME GC-MS, foi otimizado um método de análise cromatográfica para identificar e quantificar os compostos geosmina, oct-1-en-3-ol e MIB. No entanto, a sua utilização confirmou não serem estes os compostos presentes nas nove rolhas de cortiça analisadas.

6 Avaliação do Trabalho Realizado

6.1 Objetivos Realizados

Um dos objetivos deste trabalho consistiu em determinar o limiar de detecção sensorial de TCA em diferentes vinhos por parte de um painel de provadores especializados. Outro objetivo deste projeto consistiu na comparação de dois métodos de análise sensorial: a “maceração” a seco e a maceração em água. O terceiro objetivo prendeu-se com a determinação da incidência, por via sensorial e cromatográfica, de vários compostos que contaminam das rolhas de cortiça natural.

Os três objetivos foram cumpridos, havendo, contudo, trabalho que deve ser feito de forma a aprofundar tanto a determinação dos limiares de detecção de TCA no vinho, como a incidência de contaminantes nas rolhas.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante o estágio foram realizadas diversas atividades em paralelo com o trabalho de investigação deste projeto. A autora colaborou com o laboratório de controlo da qualidade do I&D, auxiliando os trabalhos de rotina diária, onde são analisadas cerca de 6000 amostras semanalmente. A autora tratou, ainda, de reclamações de clientes e preparou várias provas sensoriais destinadas a outros projetos tanto em vinho, como em água e a seco.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Dada a quantidade de vinho disponível não foi possível realizar um teste triangular para determinar o LD e um teste de pares para conhecer o LR nas provas da CVRVV. Assim, para este último valor poder-se-iam obter resultados mais precisos, caso o estudo fosse feito de acordo com a ISO 5495 que sugere a metodologia a utilizar para a determinação do LR.

Não foi possível realizar um estudo mais aprofundado quanto à identificação e quantificação dos contaminantes presentes nas rolhas rejeitadas por análise sensorial, devido a limitações de capacidade do GC-MS para as amostras deste projeto. O MDMP, o IPMP e a Oct-1-en-3-ona não foram analisados, uma vez que não havia no departamento um método implementado e operacional e, dadas as limitações de tempo, não foi possível desenvolvê-lo.

Outra das limitações do trabalho teve a ver com a impossibilidade de realizar o engarrafamento e portanto de estudar a influência das rolhas contaminadas no vinho.

Como trabalho futuro, será necessário aprofundar os estudos ao nível de análise sensorial por “maceração” a seco e otimizar os métodos cromatográficos na identificação de outros contaminantes para além do TCA. De facto, apesar de este composto ser o principal contaminante do vinho aqueles outros poderão vir a influenciar a evolução do vinho de forma significativa, facto pouco conhecido até hoje.

6.4 Apreciação final

Este projeto é o primeiro a ser desenvolvido no departamento de I&D da Amorim & Irmãos cujo principal foco diz respeito à análise sensorial.

Este trabalho permitiu o estudo dos limiares de deteção sensorial a partir de um painel bastante especializado de provadores de vinho. A compreensão destes valores é uma mais-valia para esta empresa, já que torna obrigatória a redução dos níveis de deteção de TCA pela MDI para ordens de grandeza dos 0,5 ng/L. Embora este valor estivesse sempre nos objetivos da empresa, a verdade é que se tivessem sido obtidos valores superiores de LD, poderia haver, pela A&I, a tentação de não serem realizados esforços suplementares de otimização deste equipamento (MDI).

Permitiu, ainda, a otimização de um método cromatográfico capaz de detetar e quantificar compostos como a geosmina, o oct-1-en-3-ol e o MIB que podem ser encontrados, pontualmente, em rolhas de cortiça natural.

Ter tido a oportunidade de estagiar numa empresa com a relevância da Amorim & Irmãos é uma experiência de incalculável valor. A importância e abrangência desta organização no panorama da economia nacional e internacional permitiu à autora contactar com diferentes modos de atuação e saberes diversificados. Também no âmbito da investigação científica, o papel desempenhado por esta instituição permitiu o alargamento de horizontes e a atualização experiencial do saber científico adquirido ao longo do curso. Para tal, foi, ainda, bastante enriquecedora a oportunidade de conhecer vários setores da empresa, desde a matéria-prima até à produção de vários tipos de rolhas.

Referências

- Amon, J. M., Vandeepeer, J. M., e Simpson, R. F. (1989). Compounds Responsible for Cork Taint. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 4, 62-69.
- APCOR. (2010). Cortiça. Cultura. Natureza. Futuro. [Qualidade]. [<http://www.apcor.pt/userfiles/File/Qualidade.pdf>]. Acedido em abril 2015.
- APCOR. (2014). Cortiça/ Cork. *Anuário APCOR*.
- APCOR. (2015). Rolhas Naturais. [<http://www.apcor.pt/artigo/242.htm>]. Acedido em abril 2015.
- Azevedo, J., Fernandes, I., Lopes, P., Roseira, I., Cabral, M., Mateus, N., e Freitas, V. (2014). Migration of Phenolic Compounds from Different Cork Stoppers to Wine Model Solution: Antioxidant and Biological Relevance. *European Food Research and Technology*, 239, 951-960.
- Boutou, S., e Chatonnet, P. (2006). Rapid Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Assay for the Quantitative Determination of Some of the Main Odorants Causing Off-Flavours in Wine. *Journal of Chromatography A*, 1141, 1-9.
- Buser, H. R., Zanier, C., e Tanner, H. (1982). Identification of 2,4,6-Trichloroanisole as a Potent Compound Causing Cork Taint in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 359-362.
- C. E. Liège. (2011). Código Internacional Das Práticas Rolheiras, Versão 6.03. [<http://www.apcor.pt/userfiles/File/CIPR/CIPR2011PT.pdf>]. Acedido em maio 2015.
- Cabral, M., Roseira, I., e Lopes, P. (2009). Amorim: Un Caso De Suceso En La Lucha Contra El Tca. *Revista Enología*, 3, 26-28.
- Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Barker, D. A., McLean, H. J., Pollnitz, A. P., e Sefton, M. A. (1999). Absorption of Chloroanisoles from Wine by Corks and by Other Materials. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 91-98.
- Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., e Sefton, M. A. (2002). Permeation of 2,4,6-Trichloroanisole through Cork Closures in Wine Bottles. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 8, 196-199.
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Bouton, S., e Labadie, M. D. (2004). Identification and Responsibility of 2,4,6-Tribromoanisole in Musty, Corked Odors in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1255-1262.

- Chaudhry, G. R., e Chapalamadugu, S. (1991). Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Microbiological Reviews*, 55(1), 59-79.
- Coque, J. J. R., Rodríguez, M. L. A., Goswami, M., e Martínez, R. F. (2006). *Causes and Origins of Wine Contamination by Haloanisoles (Chloroanisoles and Bromoanisoles)*. Espanha: INBIOTEC.
- Corticeira Amorim. (2014). A Verticalização Do Negócio Como Fator De Sucesso. [<http://www.amorim.com/unidades-de-negocio/introducao/>]. Acedido em fevereiro 2015.
- Costa, C. (2012). *Otimização De Equipamento Industrial Para a Quantificação De 2,4,6-Tricloroanisol*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.
- Curtis, R. F., Dennis, C., Gee, J. M., Gee, M. G., Griffiths, M. N., Land, D. G., ... Robinson, D. (1974). Chloroanisoles as a Cause of Musty Taint in Chickens and Their Microbiological Formation from Chlorophenols in Boiler House Litter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 811-828.
- Duerr, P. (1985). *Wine Quality Evolution*. Carvallis, Oregon State University. USA.
- Fortes, M. A., Rosa, M. E., e Pereira, H. (2004). *A Cortiça*. Lisboa, Portugal: Editora IST Press.
- Francis, L., Field, J., Gishen, M., Valente, P., Lattey, K., Hoj, P., ... Godden, P. (2003). The Awri Closure Trial: Sensory Evolution Data 36 Months after Bottling. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, 475, 59-64.
- Franson, P. (2010). Catching All Bad Corks - Wineries Use 'Dry Soak' Screening for Large Format Bottles. *Wines & Vines*(November Edition), 26-27.
- Godden, P., Lattey, K., Francis, L., Gishen, M., Cowey, G., Holdstock, M., ... Costa, N. (2005). Towards Offering Wine to the Consumer in Optimal Condition - the Wine, the Closures and Other Packaging Variables: A Review of Awri Research Examining the Changes That Occur in Wine after Bottling. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, 20(4), 20-30.
- Griffiths, N. M. (1974). Sensory Properties of Chloroanisole. *Chemical Senses And Flavor*, 1, 187-195.
- Guimarães, I. (2015). *Deteção Individual De Tca Em Rolhas De Cortiça: Otimização De Um Sistema Para Análise De Rolhas Naturais*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.

- Hervé, E., Price, S., Burns, G., e Weber, P. (2004). Chemical Analysis of Tca as Quality Control Tool for Natural Cork., [<http://www.corkqc.com/currentresearch/CorkTaint/ETS%20CQC-SPME.pdf>]. Acedido em abril 2015.
- Howland, P. R., Pollnitz, A. P., e Liacopoulus, D. (1997). The Location of 2,4,6-Trichloroanisole in a Batch of Contaminated Wine Corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 141-145.
- International Wine and Spirit Research. (2014). Press Release - Regional Duty-Free Trends Reverse as Asia Falls and Europe Gains Market Share. Acedido em junho 2015.
- ISO. (2005). Standard 22308: Cork Stoppers - Sensory Analysis.
- Juanola, R., Guerreiro, L., Subirá, D., Salvadó, V., Insa, S., Garcia Regueiro, J. A., e Anticó, E. (2004). Relationship between Sensory and Instrumental Analysis of 2,4,6-Trichloroanisole in Wine and Cork Stoppers. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 291-297.
- Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J. B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., e Chassagne, D. (2010). Wine Oxidation and the Role of Cork. *Food Science and Nutrition*, 50(1), 20-52.
- Lee, T. H., e Simpson, R. F. (1992). *Microbiology and Chemistry of Cork Taints in Wine*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- Lefebvre, A., Riboulet, M., Boidron, N., e Ribereau-Gayon, P. (1983). Incidence Des Microorganismes Du Liege Sur Les Alterations Olfactives Du Vin. *Science des Aliments*, 3, 265-278.
- Lopes, P., Marques, J., Lopes, T., Lino, J., Coelho, J., Alves, C., ... Cabral, M. (2011). Permeation of D5-2,4,6-Trichloroanisole Via Vapor Phase through Different Closures into Wine Bottles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(2), 245-249.
- Macku, C., Gonzalez, L., Schleussner, C., Mesquita, A. C., Herwatt, J. W., Kirch, L. C., e Schwartz, R. J. (2009). Sensory Screening for Large-Format Natural Corks by "Dry Soak" Testing and Its Correlation to Headspace Solid-Phase Microextraction (Spme) Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Gc/Ms) Releasable Trichloroanisole (Tca) Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7962-7968.
- Moutinho, S. (2008). Colóquio ALABE: "Análise Sensorial: Uma Linguagem Universal". Casa Ferreirinha. 14 novembro 2014.
- Neidleman, S. L., e Geigert, J. (1986). Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications (pp. 126). Chichester Ellis Horwood.

- Pickering, G. J., Lin, J. Y., Riesen, R., Reynolds, A., Brindle, I., e Soleas, G. (2004). Influence Os Harmonia Axyridis on the Sensory Properties of White and Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 153-159.
- Prescott, J., Norris, L., Kunst, M., e Kim, S. (2005). Estimating a “Consumer Rejection Threshold” for Cork Taint in White Wine. *Food Quality and Preference* 16, 345-349.
- Riboulet, J., Alves, L. A. R., e Urreizti, N. (2002). Quantificação Dos Cloroanisóis Por Micro Extracção Em Fase Sólida (Spme) E Cromatografia Gasosa (Gc) Com Detecção Por Espectrometria De Massa (Ms) Em Macerados De Lotes De Rlhas De Cortiça Ou Em Vinho. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 17(2), 61-71.
- Sefton, M. A., e Simpson, R. F. (2005). Compounds Causing Cork Taint and the Factors Affecting Their Transfer from Natural Cork Closures to Wine - a Review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 226-240.
- Simpson, R. F. (1990). Cork Taint in Wines: A Review of the Causes. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 5, 286-296.
- Simpson, R. F., Capone, D. L., Duncan, B. C., e Sefton, M. A. (2005). Incidence and Nature of ‘Fungal Must’ Taint in Wine Corks. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 20(1), 26-31.
- Simpson, R. F., e Sefton, M. A. (2007). Origin and Fate of 2,4,6-Trichloroanisole in Cork Bark and Wine Corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 106-116.
- Tanner, H., Zanier, C., e Würdig, C. (1981). Zur Analytischen Differenzierung Von Muffon Und Korkgeschmack in Wein. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, 117, 752-757.
- Thevenet, Y., Woller, R., Bosch, L. R., Mouries, G. M., Gyr, J.-P., Carvalho, L., ... Perkins, I. (Não datado). Quercus- Quality Experiments to Determine the Compounds Responsible and Eliminate the Causes of Undesirable Sensory Characteristics in Drinks Stoppered with Cork. *Practical Winery and Vineyard* 17(5), 59.

Anexo 1 - Propriedades químicas dos vinhos estudados na CVRVV

Tabela 14 - Propriedades químicas dos vinhos utilizados nas provas sensoriais.

	Le Tose	St. Hallett	Cuvée Saint-Vincent	Herbert Bretz	Beaujolais Nouveau	Château D'Aurilhac	Bernard Robert	Domaine Cheillon-Chezeaux	Château Roquefort Rouge
Título alcoométrico volúmico adquirido (% vol.)	10,5	12,2	13,7	12,3	12,3	14,2	12	11,8	13,2
Massa volúmica (g/cm ³)	0,9984	0,9896	0,9942	0,9946	0,992	0,9914	0,9912	0,9928	0,9914
Açúcares totais (g/dm ³)	16,3	<1,5 (LQ)	3,3	8,4	<1,5 (LQ)	<1,5 (LQ)	3,5	<1,5 (LQ)	<1,5 (LQ)
Acidez total (g ácido tartárico/dm ³)	6,1	6,1	5,5	7,4	5	4,6	7,2	5,9	4,8
Acidez volátil (g ácido acético/dm ³)	0,28	0,52	0,49	0,38	0,40	0,44	0,54	0,64	0,50
pH	3,3	3,25	3,57	3,45	3,61	3,5	3,12	3,43	3,54
Dióxido de enxofre livre (mg/dm ³)	28	11	19	49	15	8	<8 (LQ)	13	22
Dióxido de enxofre total (mg/dm ³)	141	59	48	140	36	34	22	40	68
Densidade ótica a 420 nm	0,053	0,109	5,025	0,083	2,313	6,074	0,117	1,205	2,852
Densidade ótica a 520 nm	-	-	6,416	-	3,534	6,932	-	1,344	3,378
Densidade ótica a 620 nm	-	-	-	-	0,804	1,714	-	0,289	0,844

Todos os valores acima apresentados foram obtidos pela CVRVV, utilizando os métodos aí implementados.

Anexo 2 - Características dos lotes utilizados na comparação dos dois métodos de análise sensorial

Tabela 15 - Características dos lotes estudados na comparação dos métodos de análise sensorial.

Lote	Calibre (mm x mm)	Classe
1	45x24	E
2	45x24	E
3	49x24	E
4	45x24	H
5	49x24	G
6	49x24	D
7	45x24	F
8	45x24	H
9	49x24	G
10	49x24	G
11	45x24	H
12	45x24	E
13	49x24	G
14	49x24	G

Anexo 3 - Equipamento cromatográfico

Método de análise

- SPME GC-MS: micro-extração em fase sólida com cromatografia gasosa e espectrometria de massa

Equipamento utilizado

- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa: Shimadzu GCMS - QP 2010 Plus
- Auto-sampler: CombiPAL equipado com um módulo SPME que permite que a introdução e extração das amostras sejam feitas de forma automática, contínua e reproduzível
- Programa de aquisição de dados: LabSolutions, GCMSsolution, V4.11
- Coluna: Zebron®, Capillary GC Column ZB-5Msi com um comprimento de 30 m, um diâmetro interno de 0,25 mm e uma espessura de filme de 0,25 µm
- Fibra: Sigma-Aldrich Co., com 100 µm de revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS)
- Gás de arraste: Hélio a operar a um caudal linear de 1,66 mL/min



Figura 7 - Equipamento de análise por GC-MS: a) auto-sampler; b) GC; c) MS.

Anexo 4 - Método utilizado para análise por SPME GC-MS

Compostos a analisar

- Geosmina
- MIB
- Oct-1-en-3-ol
- TCA

Condições de operação- GC

Tabela 16 - Programa de temperaturas.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0	60
14,5	205
17	280

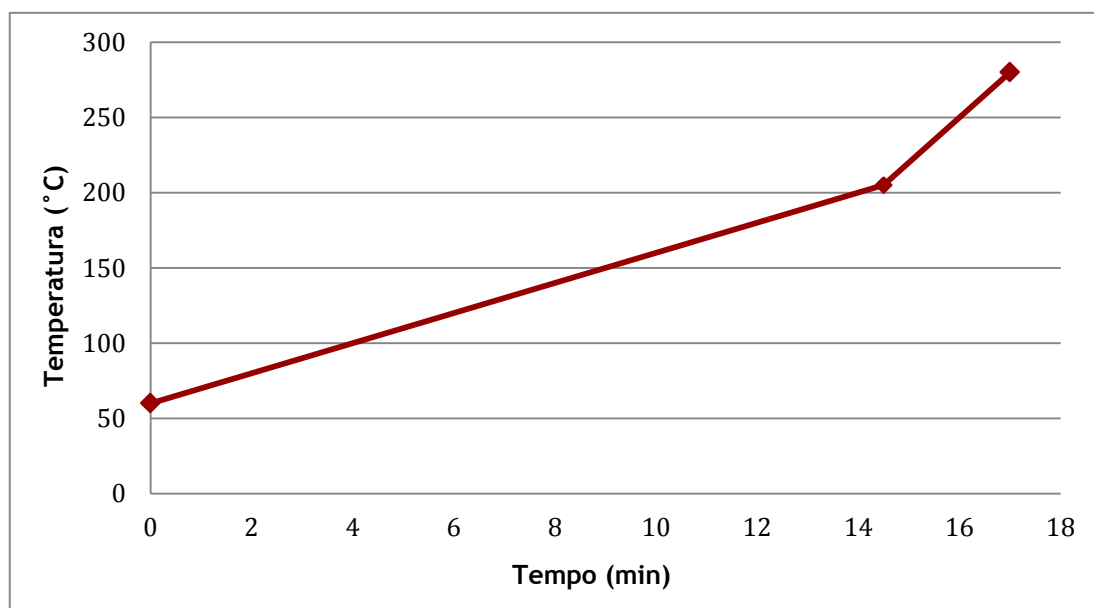


Figura 8 - Programa de temperaturas.

Após uma pré-incubação de 3 min a 50°C e uma velocidade de agitação 250 rpm, dá-se a extração para a fibra que ocorre durante 30 minutos a 50°C e à mesma velocidade de agitação. Por fim, a desorção dos compostos da fibra para o injetor dá-se durante 4 min a 270°C, em modo *splitless*. Após 1 minuto de desorção a válvula é fechada e inicia-se a purga com hélio a uma pressão de 103,2 kPa e um caudal de 1,66 mL/min, iniciando-se a desorção dos compostos para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos mesmos.

Anexo 5 - Parâmetros da análise cromatográfica dos compostos de interesse

Para ser possível a quantificação de todos os compostos que se pretende analisar é necessário efetuar retas de calibração nas gamas de concentração de interesse. Assim sendo, realizaram-se retas de calibração, constituídas por nove padrões de concentrações crescentes para os compostos geosmina, Oct-1-en-3-ol, MIB com os d_5 -TCA e d_5 -4EG como padrões internos. Relativamente ao TCA, não foi necessário realizar reta de calibração, uma vez que o método de análise deste composto já se encontrava implementada. Todas as calibrações foram realizadas em matriz de solução hidroalcoólica a 6% (para geosmina, oct-1-en-3-ol e MIB) e 12% (para o TCA). Na Tabela 17 encontram-se os dados relativos à calibração dos compostos geosmina, Oct-1-en-3-ol, MIB e TCA e nas Figura 9, Figura 10, Figura 11 e Figura 12 encontram-se as respetivas retas de calibração.

Tabela 17 - Parâmetros da análise cromatográfica dos compostos de interesse.

Padrão Interno	Compostos	lão de quantificação (m/z)	Tempo Retenção (min)	LD no Vinho	Gamas de análise
d_5 -TCA	TCA	210	4,011	3 ng/L	0 - 20 ng/L
	MIB	135	5,400	55 ng/L	0 - 2000 ng/L
	Geosmina	182	8,550	50 ng/L	0 - 500 ng/L
d_5 -4EG	Oct-1-en-3-ol	72	3,000	40 µg/L	0 - 200 µg/L
d_5 -TCA		215	7,550		500 ng/L
d_5 -4EG		139	8,300		200 µg/L

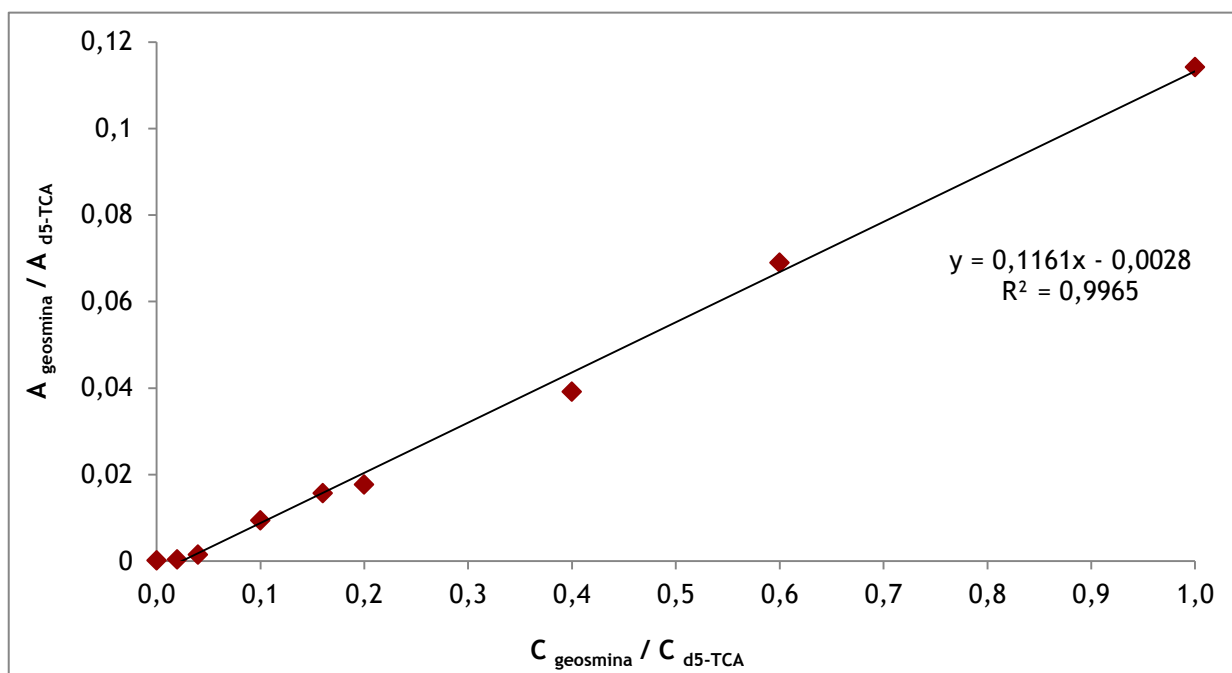


Figura 9 - Reta de calibração da geosmina.

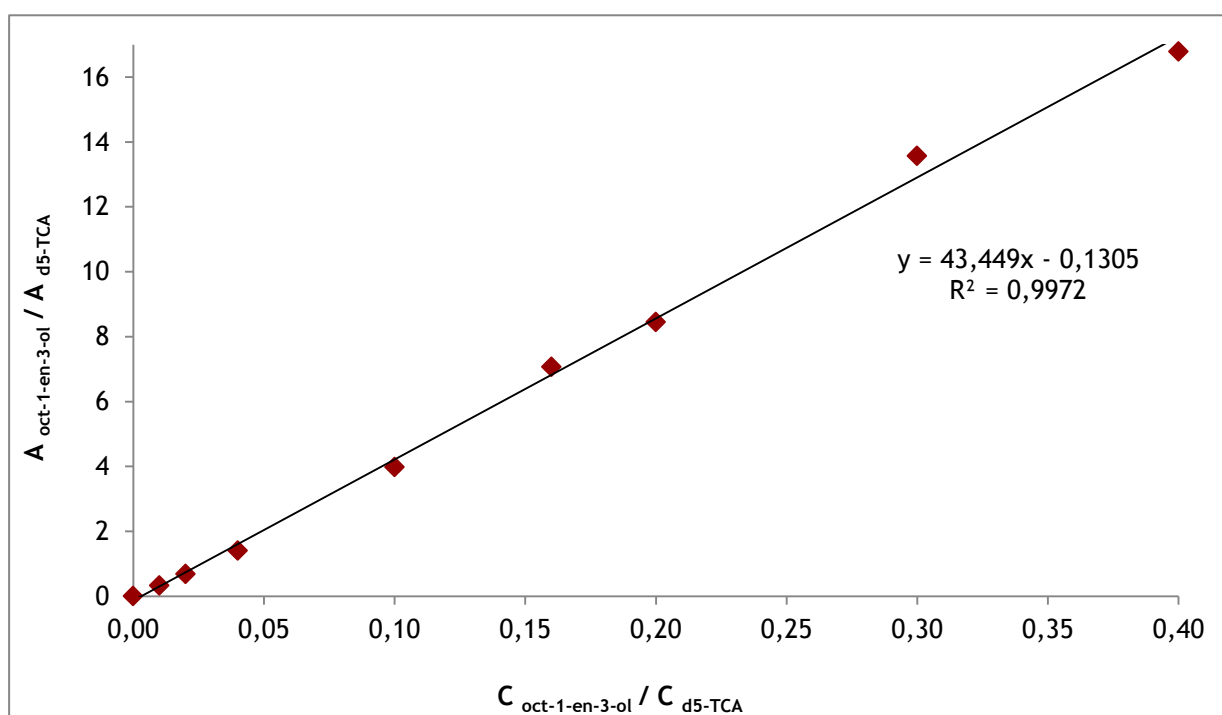


Figura 10 - Reta de calibração do oct-1-en-3-ol.

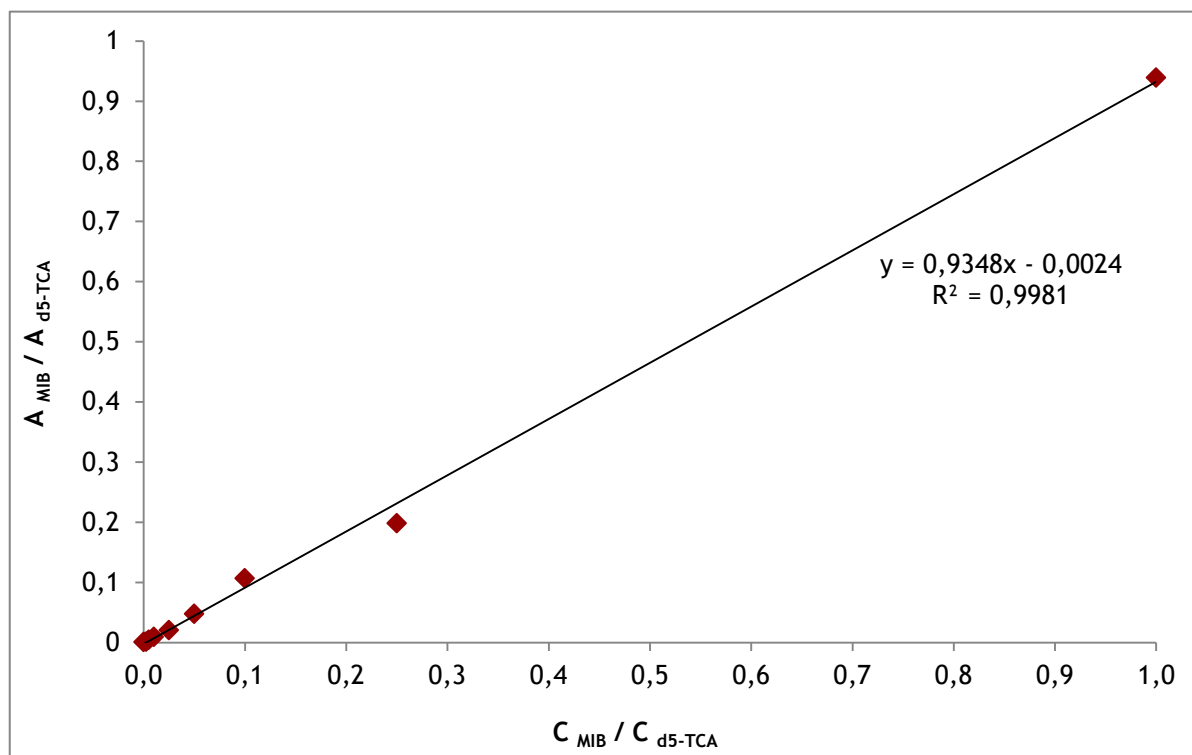


Figura 11 - Reta de calibração do MIB.

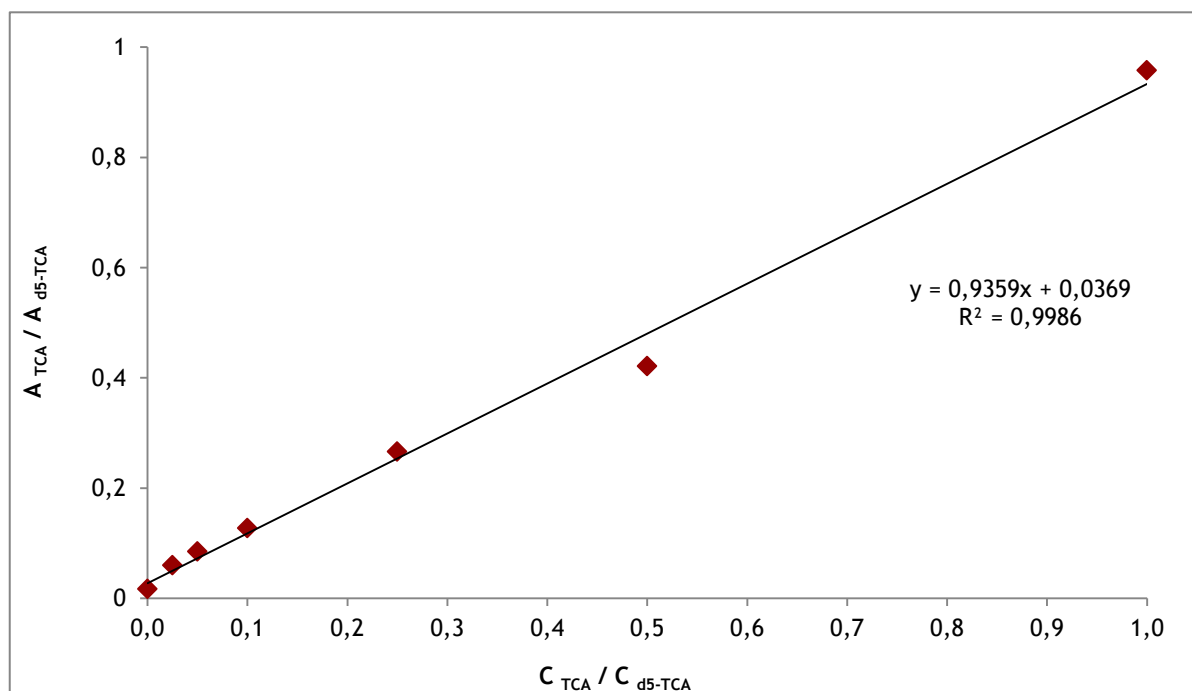


Figura 12 - Reta de calibração do TCA.

Anexo 6 - Limites de quantificação

Para se determinar os limites de quantificação foram preparadas 10 réplicas de cada um dos padrões constituintes da reta de calibração para todos os compostos em análise. O limite de quantificação do TCA já havia sido estudado. O método de preparação e de análise estatística encontram-se detalhados de seguida.

Método de preparação das amostras

- Colocar 3 g de sal (NaCl) em todos os tubos de cromatografia (*vial*), usando o dispensador de sal
- Colocar 9,4 mL de solução hidroalcoólica a 6% (v/v) em todos os tubos
- Adicionar as concentrações necessárias dos compostos para preparar os diferentes padrões
- Analisar no GC-MS com o método já referido no Anexo 4
- Tratar estatisticamente os resultados:
 - Calcular a média das concentrações obtidos para cada padrão
 - Determinar o desvio padrão
 - Calcular o coeficiente de variação (o limite de quantificação corresponde ao padrão de menor concentração cujo coeficiente de variação seja inferior a 10%)

Anexo 7 - Cálculo do LD e do LR pelos dois métodos estatísticos

Tabela 18 - Determinação do LD do vinho Cuvée Saint-Vincent através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações corretas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
6	Cuvée Saint-Vincent Vinho branco 13%	0,5	2	NÃO	0,33	0,83
		1	4	NÃO	0,67	0,83
		2	6	**	1,00	0,83
		4	6	**	1,00	0,83
		8	6	**	1,00	0,83

Tabela 19 - Determinação do LD do vinho Cuvée Saint-Vincent através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)					BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	
Provador 1	0	+	+	+	+	0,7
Provador 2	0	+	+	+	+	0,7
Provador 3	+	+	+	+	+	0,5
Provador 4	0	0	+	+	+	1,4
Provador 5	+	+	+	+	+	0,5
Provador 6	0	0	+	+	+	1,4
Média Geométrica do grupo						0,8

Tabela 20 - Determinação do LD do espumante Le Tose através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
6	Le Tose Espumante 11%	0,5	4	NÃO	0,67	0,83
		1	5	*	0,83	0,83
		2	6	**	1,00	0,83
		4	6	**	1,00	0,83
		8	6	**	1,00	0,83

Tabela 21 - Determinação do LD do espumante Le Tose através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)					BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	
Provador 1	+	+	+	+	+	0,5
Provador 2	0	+	+	+	+	0,7
Provador 3	0	0	+	+	+	1,4
Provador 4	+	+	+	+	+	0,5
Provador 5	+	+	+	+	+	0,5
Provador 6	+	+	+	+	+	0,5
Média Geométrica do grupo						0,6

Tabela 22 - Determinação do LD do vinho St. Hallett através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
6	St. Hallett Vinho tinto 14%	0,5	1	NÃO	0,17	0,83
		1	1	NÃO	0,17	0,83
		2	4	NÃO	0,67	0,83
		4	5	*	0,83	0,83
		8	5	*	0,83	0,83
		16	6	*	1,00	

Tabela 23 - Determinação do LD do vinho St. Hallett através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	0	+	+	+	+	1,4
Provador 2	0	0	+	+	+	+	1,4
Provador 3	0	0	0	+	0	+	11,3
Provador 4	+	0	0	+	+	+	2,8
Provador 5	0	0	+	0	+	+	5,7
Provador 6	0	+	+	+	+	+	0,7
Média Geométrica do grupo							2,5

Tabela 24 - Determinação do LD do vinho Herbert Bretz através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
3	Herbert Bretz Vinho branco 13%	0,5	2	NÃO	0,67	1,00
		1	3	*	1,00	1,00
		2	3	*	1,00	1,00
		4	3	*	1,00	1,00
		8	3	*	1,00	1,00
		16	3	*	1,00	1,00

Tabela 25 - Determinação do LD do vinho Herbert Bretz através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 2	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 3	+	+	+	+	+	+	0,5
Média Geométrica do grupo							0,6

Tabela 26 - Determinação do LD do vinho Beaujolais Nouveau através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
3	Beaujolais Nouveau Vinho tinto 12%	0,5	0	NÃO	0,00	1,00
		1	3	*	1,00	1,00
		2	2	NÃO	0,67	1,00
		4	3	*	1,00	1,00
		8	3	*	1,00	1,00
		16	3	*	1,00	1,00

Tabela 27 - Determinação do LD do vinho Beaujolais Nouveau através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 2	0	+	0	+	+	+	2,8
Provador 3	0	+	+	+	+	+	0,7
Média Geométrica do grupo							1,1

Tabela 28 - Determinação do LD do vinho Château D'Aurilhac através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
3	Château D'Aurilhac Vinho tinto 14%	0,5	2	NÃO	0,67	1,00
		1	2	NÃO	0,67	1,00
		2	2	NÃO	0,67	1,00
		4	3	*	1,00	1,00
		8	3	*	1,00	1,00
		16	3	*	1,00	1,00

Tabela 29 - Determinação do LD do vinho Château D'Aurilhac através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	0	+	+	+	+	1,4
Provador 2	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 3	+	+	0	+	+	+	2,8
Média Geométrica do grupo							1,3

Tabela 30 - Determinação do LD do champanhe Bernard Robert através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
5	Bernard Robert Champanhe 12%	0,5	3	NÃO	0,60	0,80
		1	3	NÃO	0,60	0,80
		2	5	**	1,00	0,80
		4	5	**	1,00	0,80
		8	5	**	1,00	0,80
		16	5	**	1,00	0,80

Tabela 31 - Determinação do LD do champanhe Bernard Robert através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	+	0	+	+	+	+	1,4
Provador 2	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 3	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 4	0	0	+	+	+	+	1,4
Provador 5	+	+	+	+	+	+	0,5
Média Geométrica do grupo							0,8

Tabela 32 - Determinação do LD do vinho Domaine Cheillon-Chezeaux através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
5	Domaine Cheillon-Chezeaux Vinho tinto 12,5%	0,5	2	NÃO	0,40	0,80
		1	3	NÃO	0,60	0,80
		2	4	*	0,80	0,80
		4	5	**	1,00	0,80
		8	5	**	1,00	0,80
		16	5	**	1,00	0,80

Tabela 33 - Determinação do LD do vinho Domaine Cheillon-Chezeaux através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	+	0	+	+	+	+	1,4
Provador 2	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 3	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 4	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 5	0	0	0	+	+	+	2,8
Média Geométrica do grupo							1,0

Tabela 34 - Determinação do LD do vinho Château Roquefort Rouge através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
5	Château Roquefort Rouge Vinho tinto 13%	0,5	2	NÃO	0,40	0,80
		1	4	*	0,80	0,80
		2	4	*	0,80	0,80
		4	5	**	1,00	0,80
		8	5	**	1,00	0,80
		16	5	**	1,00	0,80

Tabela 35 - Determinação do LD do vinho Château Roquefort Rouge através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET (Média Geométrica individual)
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	+	0	+	+	+	2,8
Provador 2	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 3	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 4	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 5	0	0	+	+	+	+	1,4
Média Geométrica do grupo							0,9

Tabela 36 - Determinação do LD do vinho J. Lohr através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
4	J. Lohr Vinho tinto 13,5%	0,5	4	*	1,00	1,00
		1	1	NÃO	0,25	1,00
		2	4	*	1,00	1,00
		4	4	*	1,00	1,00
		8	4	*	1,00	1,00
		16	3	NÃO	0,75	1,00

Tabela 37 - Determinação do LD do vinho J. Lohr através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA ng/L)						BET Média Geométrica individual
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	+	0	+	+	+	+	1,4
Provador 2	+	0	+	+	+	+	1,4
Provador 3	+	0	+	+	+	0	1,4
Provador 4	+	+	+	+	+	+	0,5
Média Geométrica do grupo							1,1

Tabela 38 - Determinação do LD do vinho Louis M. Martini através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
4	Louis M. Martini Vinho tinto 13,8%	0,5	2	NÃO	0,50	1,00
		1	4	*	1,00	1,00
		2	4	*	1,00	1,00
		4	4	*	1,00	1,00
		8	4	*	1,00	1,00
		16	4	*	1,00	1,00

Tabela 39 - Determinação do LD do vinho Louis M. Martini através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA no Espumante (ng/L)						BET Média Geométrica individual
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 2	+	+	+	+	+	+	0,5
Provador 3	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 4	+	+	+	+	+	+	0,5
Média Geométrica do grupo							0,6

Tabela 40 - Determinação do LD do vinho do Porto Branco através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Crítério de significância a 5%
3	Porto Branco Vinho do Porto 20%	0,5	1	NÃO	0,33	1,00
		1	1	NÃO	0,33	1,00
		2	2	NÃO	0,67	1,00
		4	2	NÃO	0,67	1,00
		8	3	*	1,00	1,00
		16	3	*	1,00	1,00

Tabela 41 - Determinação do LD do vinho do Porto Branco através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET Média Geométrica individual
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	0	0	0	+	+	5,7
Provador 2	0	+	+	+	+	+	0,7
Provador 3	+	0	+	+	+	+	1,4
Média Geométrica do grupo							1,8

Tabela 42 - Determinação do LD do vinho do Porto Tawny através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
3	Porto Tawny Vinho do Porto 20%	0,5	0	NÃO	0,00	1,00
		1	1	NÃO	0,33	1,00
		2	1	NÃO	0,33	1,00
		4	3	*	1,00	1,00
		8	2	NÃO	0,67	1,00
		16	3	*	1,00	1,00

Tabela 43 - Determinação do LD do vinho do Porto Tawny através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET Média Geométrica individual
	0,5	1	2	4	8	16	
Provador 1	0	0	0	+	0	+	11,3
Provador 2	0	0	+	+	+	+	1,4
Provador 3	0	+	0	+	+	+	2,8
Média Geométrica do grupo							3,6

Tabela 44 - Determinação do LD do vinho do Porto Ruby através o método binomial.

Nº de provadores	Matriz	Concentração (ng/L)	Nº de avaliações correctas	Diferença estatisticamente significativa	Proporção de provadores que identificaram a amostra diferente	Critério de significância a 5%
3	Porto Ruby Vinho do Porto 20%	0,5	2	NÃO	0,67	1,00
		1	2	NÃO	0,67	1,00
		2	2	NÃO	0,67	1,00
		4	3	*	1,00	1,00
		8	3	*	1,00	1,00
		16	3	*	1,00	1,00

Tabela 45 - Determinação do LD do vinho do Porto Ruby através do método BET.

Provadores	Concentrações de TCA (ng/L)						BET Média Geométrica individual
	0,5	1	2	4	8	16	
Bento Amaral	+	0	0	+	+	+	2,8
Manuel Lima Ferreira	+	+	+	+	+	+	0,5
Manuel Maria Pinto	0	+	+	+	+	+	0,7
Média Geométrica do grupo							1,0

